CAMILA TEIXEIRA MENDES

**LÍTIO E EXPRESSÃO GÊNICA: IMPLICAÇÕES PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia
da Universidade de São Paulo/Instituto
Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas,
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia**

São Paulo

2008

LÍTIO E EXPRESSÃO GÊNICA: IMPLICAÇÕES PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

CAMILA TEIXEIRA MENDES

**Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia
da Universidade de São Paulo/Instituto
Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas,
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia**

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Emmanuel Dias Neto

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Mendes, Camila Teixeira.

Lítio e expressão gênica: implicações na doença de Alzheimer /
Camila Teixeira Mendes. -- São Paulo, 2008.

Orientador : Emmanuel Dias Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética.

Versão do título para o inglês: Lithium and gene expression:
implications to Alzheimer disease.

Descritores: 1. Lítio 2. Doença de Alzheimer 3. Expressão gênica
4. GSK3b 5. Proteoma 6. RASH I. Neto, Dias Emmanuel II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB037/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Camila Teixeira Mendes.

Título da Tese: Lítio e expressão gênica: implicações para a doença de Alzheimer.

Orientador(a): Emmanuel Dias Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A parte prática deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Para seu desenvolvimento recebemos o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) – Bolsa de doutorado, Processo: 04/01478-2

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) – Projeto de pesquisa: Metabolismo de Fosfolípidos em doenças Neuropsiquiátricas. Coordenador: Wagner Farid Gattaz. Vigência: Dezembro de 2003 a Novembro de 2007. Processo: 02/13633-7

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) - Projeto de pesquisa: Lítio, neuroproteção e memória: das bases moleculares à aplicação clínica. Coordenador: Wagner Farid Gattaz. Processo: 554535/2005-0;

- Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (**ABADHS**)

“Aos meus pais, meus grandes incentivadores, pelo amor sempre presente, por todo apoio, carinho e torcida. Obrigada por serem sempre meu ‘porto-seguro’ e minha sustentação.”

“Aos meus irmãos pelo carinho de sempre e pelo orgulho que isto lhes proporciona.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Emmanuel Dias Neto pela oportunidade de realizar essa tese. Por ter depositado em mim sua confiança quando me convidou a integrar sua equipe e por ser um exemplo profissional que vai além da bancada. Agradeço também pelas oportunidades que proporcionou para meu crescimento como pesquisadora.

Ao Professor Wagner Farid Gattaz por ser o responsável por tudo isso acontecer, não só por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório, mas por ser responsável pela minha vinda a São Paulo e inserção em sua equipe.

Aos colaboradores do projeto: Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto e Dra. Eloísa de Sá Moreira por toda ajuda e ensinamentos sobre qPCR, por serem sempre tão solícitos e por todo apoio e incentivo.

Ao amigo Daniel Martins e toda equipe do Laboratório de Proteômica do Prof. Dr. José Camillo Novello- Unicamp por abrirem meus olhos para o mundo das proteínas, pelos ensinamentos e a grandiosa ajuda nas análises de proteoma. Especialmente por fazerem minhas idas à Campinas algo sempre tão agradável e divertido.

Ao companheiro de “setor” Fabio Borges Mury pela amizade, companheirismo e excelente trabalho em equipe. Obrigada pela compreensão nos momentos delicados e pelo carinho.

À Dra. Elida Benquique Ojopi por sua amizade sincera e pela sempre pronta ajuda com as ferramentas de bioinformática, com o desenvolvimento da técnica de RaSH e, principalmente, nas análises. Sobretudo pela ajuda em todas minhas dúvidas, mancadas, tropeços... Por estar sempre pronta e disponível para me amparar.

À amiga Sandra Cardoso por sua amizade, pelo carinho com que me cuida, pelos conselhos nos momentos difíceis e pelas muitas risadas e gargalhadas nos momentos de alegria.

À Sheila Gregório e Bárbara Nogueira pela amizade ao longo de todos esses anos, risadas e pela convivência tão agradável no laboratório.

Aos “velhos” e “novos” amigos da equipe de genética do LIM-27 que contribuirão de alguma forma para a realização dessa tese.

À toda a equipe do LIM-27, em especial Leda Talib e Zelinda Garcia, pelo suporte, disponibilidade e ajuda.

Ao André Becker por ser tão especial e me dar todo suporte. Suporte emocional com seus conselhos e suporte na execução de meu trabalho com suas inúmeras caronas e até mesmo dentro do laboratório na árdua tarefa de picar bactérias.

Aos colaboradores do SSH e RaSH: Prof. Dr. Gustavo Goldman e Everaldo dos Reis Marques, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP; Dr. Paulo Peitl, FMRP-USP; e Murilo Vieira por toda consultoria no aprendizado dessas técnicas.

À Dra Paula Nunes pelo encaminhamento dos pacientes e a coleta dos dados clínicos.

Ao Dr. Paulo Sallet por sua disponibilidade em fazer a leitura e revisão da parte clínica dessa tese. Obrigada pela leitura tão minuciosa e pela discussão.

RESUMO

Mendes CT. Lítio e expressão gênica: implicações para a doença de Alzheimer [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A expressão aumentada de GSK3b em pacientes com a doença de Alzheimer (DA), aparentemente está relacionada com a formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares, os achados patológicos mais característicos desta importante doença. Devido ao seu papel central na patogênese da DA, GSK3b é um importante alvo da indústria farmacêutica. Os sais de lítio têm sido usados na profilaxia e no tratamento do transtorno bipolar por mais de 50 anos. Seus efeitos inibitórios diretos e indiretos sobre a atividade de GSK3 foram documentados por diversos grupos, mas sempre tiveram como foco principal uma análise dos efeitos lítio sobre a proteína GSK3, enquanto que os possíveis efeitos do lítio sobre a transcrição de GSK3 ainda não foram avaliados. Neste estudo, utilizamos PCR quantitativa pós transcrição reversa, para avaliar os efeitos do lítio sobre os níveis do mRNA de *Gsk3a* e *Gsk3b* em culturas primárias de neurônios corticais e hipocâmpais de rato tratados com diferentes doses de lítio. Nossos resultados sugeriram que lítio é capaz de reduzir os níveis de mRNA de *Gsk3b* hipocâmpal, de modo específico e dose-dependente. Estes dados se mostraram consistentes e foram subsequentemente comprovados *in vivo* em amostras cerebrais de ratos tratados com LiCl por 35 dias. Buscando compreender melhor os efeitos do lítio nas células neuronais, utilizamos hibridização subtrativa de cDNA e eletroforese bidimensional seguida por análise em espectômetro de massas, das proteínas derivadas de culturas de neurônios hipocâmpais tratados com o lítio. Nossos estudos sugeriram a expressão diferencial de 88 genes, além de oito *spots* representando proteínas com cerca de 50% de alteração de expressão. Estas observações sugerem novos efeitos regulatórios do lítio sobre GSK3b e fornecem potenciais alvos da ação do lítio, protéicos e transcricionais, que podem contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de ação do lítio e reforçar seu potencial para a inibição das vias patológicas chaves na DA.

Palavras-Chave: Lítio. Alzheimer. *Gsk3a*. *Gsk3b*. Expressão gênica. *In vitro*. *In vivo*.

ABSTRACT

Mendes CT. Lithium and gene expression: implications to Alzheimer disease [Doctoral Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The increased systemic expression of active GSK3 β in Alzheimer's disease (AD) patients apparently is associated with the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles, the hallmarks of this important disease. Due to its central role in the pathogenesis of AD, GSK3 β is currently a promising target of the pharmaceutical industry. Lithium salts have been used in the prophylaxis and treatment of depression and bipolar disorder for >50 years. The direct and indirect inhibitory effects of lithium over GSK3 activity have been documented by several groups. However, the effects of lithium on the mRNA transcription of GSK3 have not yet been addressed. In this study we used quantitative PCR to evaluate the transcriptional regulation of *Gsk3a* and *Gsk3b* in lithium-treated primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons. We found a significant and dose-dependent reduction in the mRNA levels of *Gsk3b*, which was specific to hippocampal cells. This same effect was further confirmed in vivo by measuring GSK3 expression in different brain regions and in peripheral leukocytes of adult rats treated with lithium. Seeking the comprehension about the effect of lithium on neurons cells we used subtractive hybridizations and two-dimensional electrophoresis patterns of culture of hippocampus neurons treated with lithium. Our results suggested the differential expression of 88 genes and 8 proteins, whose expression varied at least 50% among treated and untreated cells. These observations suggest new regulatory effects of lithium over GSK3 β and suggest new potential lithium targets, contributing to the better understanding of its mechanisms of action and reinforcing its potential for the inhibition of key AD pathological pathways.

Key Words: Lithium. Alzheimer. Gene expression. *Gsk3a*. *Gsk3b*. In vitro. In vivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Doença de Alzheimer

1.1.1 Epidemiologia

1.1.2 Diagnóstico

1.1.3 Marcadores genéticos

1.1.4 Vias metabólicas envolvidas com a doença de Alzheimer

1.2 GSK3

1.3 Lítio

1.3.1 Lítio como tratamento no Transtorno Afetivo Bipolar

1.3.2 Lítio e neuroproteção

1.3.3 Lítio e doença de Alzheimer

2 OBJETIVOS

CAPÍTULO 1 - LÍTIO E EXPRESSÃO DE GSK-3

1.1 Lítio inibe a transcrição de *GSK3 β* : evidências *in vitro* e *in vivo*

1.2 Resultados suplementares

1.2.1 Análise de expressão protéica de GSK-3 α e GSK-3 β – Western Blot

1.2.1.1 Metodologia

1.2.1.2 Resultados e Discussão

1.2.2 Análise de expressão gênica em pacientes bipolares

1.2.2.1 Metodologia

1.2.2.2 Resultados e Discussão

1.2.3 Genotipagem ApoE

1.2.3.1 Metodologia

1.2.3.2 Resultados e Discussão

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL E NO PROTEOMA, INDUZIDAS PELO LÍTIO

2.1 Análise de expressão gênica diferencial em neurônios hipocâmpais tratados com lítio

2.1.1 Metodologia

2.1.1.2 Cultura de Neurônios

2.1.1.3 RaSH (*“Rapid Subtractive-Hybridization”*)

2.1.1.4 Validação dos genes encontrados por qPCR

2.1.2 Resultados e Discussão

2.1.2.1 Genes selecionados

2.1.2.2 Validação por qPCR

2.2 Análise de proteoma de neurônios hipocâmpais tratados com lítio

2.2.1 Metodologia

2.2.1.1 Preparação das amostras

2.2.1.2 Eletroforese de bidimensional (2DE)

2.2.1.3 Análise da Imagem

2.2.1.4 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massas (MS)

2.2.2 Resultados e Discussão

3 CONCLUSÕES GERAIS

REFERÊNCIAS

ANEXO A

ANEXO B

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza por distúrbio progressivo da memória e de outras funções cognitivas, tais como linguagem, atenção, funções executivas e habilidades visoespaciais. Os sintomas da DA incluem ainda alterações do humor (depressão), da sensopercepção e julgamento (alucinações, delírios), do comportamento (agitação psicomotora, apatia, agressividade, desinibição), das funções neurovegetativas (insônia, hipersonia, alterações do apetite) e sensitivomotoras (sinais extrapiramidais, mioclonias, reflexos neurológicos primitivos).

Nos Estados Unidos, no ano de 2007, estima-se que 5,1 milhões de pessoas apresentam DA (Alzheimer's Association, 2007). No entanto, com o aumento da expectativa de vida e o conseqüente aumento do número de idosos na população, acredita-se que a prevalência aumente em cerca de três vezes, podendo chegar a 13,2 milhões de casos apenas nos Estados Unidos, no ano de 2050 (Hebert et al., 2003). Dados representativos dos países em desenvolvimento são escassos, mas acredita-se que cerca de 60% dos pacientes com DA vivam nesses países (Blennow et al., 2006). Em 2006, cerca de 26,6 milhões de pessoas em todo o mundo foram acometidas por DA, e espera-se que este número quadruplique para 100 milhões em 2050 devido ao aumento na expectativa de vida (Alzheimer's Association, 2007). Nos Estados Unidos o impacto da DA nos gastos de saúde pública, incluindo medicamentos diretos e indiretos e serviço social, foi estimado em torno de \$100 bilhões de dólares americanos em 2005 e projeta-se um aumento para \$160 bilhões em 2010 e \$189 bilhões em 2015 (Alzheimer's Association, 2007). Uma vez que ainda não existe cura para DA, o desafio maior está no desenvolvimento de novas terapias e alvos terapêuticos para o tratamento e prevenção da doença.

1.1.1 Epidemiologia

A DA é a causa mais freqüente de declínio cognitivo. Aproximadamente 7,1% da população com 65 anos de idade ou mais, tem alguma forma de demência, sendo a DA responsável por 55,1% dos casos, a demência vascular por 9,3% dos casos e a doença cerebrovascular 14,4% (Herrera et al., 2002). Em geral os pacientes evoluem para a morte em torno de 8 a 10 anos após o início dos sintomas.

A frequência populacional de uma doença envolve estimativa dos casos já existentes ou antigos (prevalência) e dos casos novos (incidência). A prevalência de uma doença se refere ao número de casos existentes, não importando se novos ou antigos, enquanto que sua incidência reflete o número de casos novos em um determinado período de tempo.

A prevalência e a incidência da DA crescem exponencialmente com o aumento da idade, a prevalência dobra aproximadamente a cada cinco anos depois dos 65 anos. Ou seja, a prevalência vai de 2% naqueles com idade entre 65 e 69 anos, para 4% naqueles que estão entre 70 - 74 anos, para 8% entre 75 - 79 anos, para 16% entre 80 - 85 anos e para 35 a 40% naqueles com idade acima de 85 anos (Kawas et al., 2000). Nos Estados Unidos, dados mais recentes mostraram que 200 mil pessoas são acometidas pela DA antes dos 65 anos de idade e dos 4,9 milhões de americanos com 65 anos ou mais acometidos por DA, 2% têm entre 65 a 74 anos, 19% têm entre 75 a 84 anos e 42% têm 85 anos ou mais (Alzheimer's Association, 2007). Observa-se uma taxa de incidência anual em torno de 1% em pessoas com 65 anos ou mais (Mortimer e Borenstein, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que entre 1950 e 2025 o número de idosos no Brasil aumentará em cerca de quinze vezes, enquanto nas outras faixas etárias estima-se um aumento de cinco vezes. Assim, o Brasil será o sexto país quanto ao contingente de idosos em 2025, devendo ter cerca de 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos (Cerqueira e Oliveira, 2002). Embora no Brasil não tenhamos dados objetivos com respeito à epidemiologia da DA, podemos estimar sua frequência em nosso meio com base em alguns índices. Utilizando dados de outros países, mas tendo como base as estatísticas populacionais brasileiras (IBGE-2000), estima-se que a prevalência da DA no Brasil seja de 1 milhão e 200 mil pacientes, com a incidência de 100 mil novos casos por ano (Garrido e Menezes, 2002). A epidemiologia da DA é linha de pesquisa relativamente recente no Brasil, mas que precisa ser desenvolvida com rapidez para permitir estratégias de saúde pública adequadas às características de nossa população. São necessários estudos de prevalência nas diversas regiões do país, estudos de incidência e de coorte que incluam o declínio cognitivo associado ao envelhecimento.

Em pesquisa feita em Catanduva (SP), 7,1% das pessoas com 65 anos ou mais apresentavam demência, sendo que DA foi diagnosticada em 55,1% desses casos (Vilela, 2006). Dados similares foram encontrados em outro estudo de prevalência de demências potencialmente reversíveis em um ambulatório especializado na cidade de São Paulo, onde num total de 275 pacientes com demência foi verificada uma prevalência de 59,6% de pacientes com DA (Takada et al., 2003). Já o estudo de incidência e taxa de mortalidade da demência em uma comunidade

com mais de 1.000 idosos revelou a incidência de 13,8/1.000 para demência e 7,7/1.000 para DA. Os índices de incidência de demência mostraram-se comparáveis aos reportados em estudos com ocidentais e asiáticos (Nitrini et al., 2004).

Além da idade, que é o mais importante fator de risco para a doença, estudos epidemiológicos sugerem a importância de vários outros fatores. Alguns podem estar ligados à redução da capacidade fisiológica cerebral, incluindo redução no tamanho do cérebro, baixo nível educacional e de habilidades ocupacionais, baixa capacidade mental durante a infância, ou à redução da atividade mental e física durante a vida adulta (Mayeux, 2003; Mortimer et al., 2003). Outros estudos apontam para o aumento do risco associado a doenças vasculares, incluindo hipercolesterolemia, hipertensão, arteriosclerose e doenças coronárias, fumo, obesidade e diabetes (Blennow et al., 2006). Mais ainda, alguns autores acreditam que dietas ricas em vitaminas homocisteínicas (como vitamina B12), antioxidantes como vitaminas C e E, ácidos graxos insaturados e o consumo de álcool, em especial de vinho, podem reduzir os riscos de DA (Luchsinger e Mayeux, 2004); estes dados são entretanto ainda inconclusivos.

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da DA envolve a combinação dos fatores clínicos associados ao achado anatomo-patológico. Embora em termos práticos o diagnóstico seja firmado com base nos critérios clínicos, o diagnóstico definitivo só pode ser obtido com a biópsia cerebral no exame *post mortem*, quando as alterações histológicas características da doença podem ser observadas (presença de placas neuríticas e de emaranhados neurofibrilares, sobretudo nas regiões de hipocampo e neocórtex) (Hye et al., 2005).

Os sintomas iniciais da DA são bastante inespecíficos, incluindo uma discreta redução da memória, freqüentemente seguida de alterações de personalidade e apatia. O prejuízo de memória piora gradualmente e aparecem déficits em outras capacidades cognitivas, como julgamento, raciocínio abstrato, cálculo, e habilidades visuoespaciais. No estágio intermediário, mais freqüentemente observa-se uma dificuldade para nomear objetos ou escolher a palavra certa para expressar uma idéia (anomia). Tal processo pode ser progressivo, e em muitos pacientes leva a uma perda total da seqüência lógica da fala (confabulação e prejuízos de construção formal). Nos estágios finais da doença, os pacientes apresentam grande alteração do ciclo sono/vigília e tendem a perambular, tornam-se episodicamente agitados, irritáveis e perdem a capacidade de atender às suas necessidades pessoais. O déficit motor também ocorre nesse estágio podendo incluir rigidez e convulsões.

O exame macroscópico do cérebro de indivíduos acometidos pela DA revela atrofia cortical em graus variáveis, com redução dos giros corticais, alargamento dos sulcos corticais e dilatação das fissuras silvianas e do sistema ventricular (Figura 1). Tais alterações resultam de perda neuronal, sobretudo nas porções mediais dos lobos temporais e no córtex parietal. O exame histológico confirma a ocorrência de perda neuronal, acompanhada de degeneração sináptica e do aparecimento de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Outras inclusões como os corpúsculos de Lewy e de Hirano também são freqüentes.

Figura 1 – Secção coronal *postmortem* de cérebro de um indivíduo idoso saudável (à esquerda) comparado com o de um paciente com DA (à direita).

FONTE: Yaari e Corey-Bloom, 2007

O processo patogênico da DA em geral tem início nas áreas límbicas do lobo temporal, mais precisamente no hipocampo e no córtex entorrinal (Braak et al., 1999). A perda neuronal ocorre sobretudo nas camadas piramidais e afeta principalmente as estruturas límbicas e os córtices associativos, com relativa preservação das áreas corticais primárias (motora, somatossensitiva e visual) (Hoffman et al., 2000). Paralelamente à perda neuronal, ocorre intensa degeneração sináptica em regiões hipocámpais (Heinonen et al., 1995) e neocorticais (Scheff et al., 1993).

As características histopatológicas principais são perdas neuronais específicas associadas aos emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles* - NFTs) nos neurônios e a deposição do peptídeo β -amilóide, que forma as placas senis (Figura 2). Os NFTs e as placas senis podem estar presentes nos cérebros com senilidade fisiológica, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa. Acredita-se que o prejuízo cognitivo na DA tenha uma correlação importante com a formação dos NFTs (Lovestone e Reynolds, 1997; Richard e Amouyel, 2001).

Figura 2 – (A) Placa senil (corada com hematoxilina e eosina) e (B) Emaranhado neurofibrilar – NFTs (corado com prata) no cérebro de paciente com DA.

Fonte: Yaari e Corey-Bloom, 2007

De ocorrência intracelular, os NFTs são compostos pelos filamentos helicoidais pareados (PHF), cujo constituinte principal é a proteína tau em estado hiperfosforilado. As proteínas tau estabilizam os microtúbulos do citoesqueleto neuronal, atividade que é regulada por processos de fosforilação e desfosforilação. Evidências sugerem que o aparecimento de tau hiperfosforilada se correlaciona positivamente com o início das alterações cognitivas, reforçando o conceito de que a piora cognitiva tenha uma progressão compatível com o grau de hiperfosforilação desta proteína (Sergeant, 1997).

As placas senis consistem da deposição extra-celular de proteína β -amilóide no parênquima cerebral. β -amilóide é um fragmento proteolítico de um precursor maior, a proteína precursora de β -amilóide (APP). As placas de β -amilóide ($A\beta$) são insolúveis, com formas diversas e, conforme o estágio da doença, estão presentes em diferentes proporções; todas, no entanto, são capazes de iniciar uma cascata de eventos que podem gerar desde discretas alterações neuríticas até a morte neuronal (Dickson e Vickers, 2001). Enquanto crescem as evidências de que o acúmulo de $A\beta$ é crítico na patogênese da doença (Hardy e Selkoe, 2002), alguns pesquisadores acreditam que $A\beta$ não seja exclusivamente responsável pelas alterações neuronais que acarretam os sintomas (Carter e Lippa, 2001).

A acurácia do diagnóstico por meio de biomarcadores tau-Total e $A\beta$ no líquido foi investigada em vários estudos. A proteína tau-Total encontra-se aumentada em torno de 300% no líquido de pacientes com DA, provavelmente em função da degeneração neuronal e axonal. Em contraste, a concentração de $A\beta$ no líquido de pacientes com DA está reduzida em torno de

50%, o que pode estar associado com a excessiva deposição de peptídeos nas placas e conseqüentes baixas concentrações desses elementos no líquido (Blennow et al., 2006). A eficácia do diagnóstico desses marcadores foi validada em casos confirmados neuropatologicamente (Sunderland et al., 2003).

1.1.3 Marcadores genéticos

Existem sólidas evidências de um envolvimento genético na DA. Estudos de famílias acometidas pela DA demonstraram um risco para desenvolver a doença em cerca de três a quatro vezes maior em parentes de pacientes quando comparados com indivíduos da população em geral. O risco relativo cresce 7,5 vezes em pessoas que têm dois ou mais parentes de primeiro grau com DA (van Duijn et al., 1991). Além disso, estima-se que 20-60% dos casos de DA apresentam caráter familiar (van Broeckhoven, 1996).

Os estudos em gêmeos têm mostrado um risco aumentado em cinco vezes para gêmeos monozigóticos concordantes para DA quando comparados com gêmeos dizigóticos. A concordância para DA em gêmeos monozigóticos é ao redor de 50% (van Broeckhoven, 1996). Levando-se em consideração todos os casos da doença, calcula-se que o componente genético corresponde a pouco mais de 50% do total de fatores responsáveis pelo desenvolvimento da DA (Chai et al, 2007).

As tentativas de identificação de possíveis genes mendelianos envolvidos com a DA, normalmente fazem uso da investigação de um grande número de famílias, com vários membros afetados nas diferentes gerações. Nesse tipo de análise a DA foi classificada em DA de início precoce ou DA de início tardio.

- DA do tipo precoce

A DA precoce surge por volta dos 45 anos (idade de aparecimento dos primeiros sintomas entre 32 e 61 anos) (Sherrington et al., 1995). Apesar desse tipo de doença ser mais raro, a distribuição da DA nas famílias afetadas sugere a presença de um gene único, do tipo dominante, como causa da doença. Nesse tipo de DA as análises de ligação (*linkage*) para a busca de locus envolvidos indicaram o gene que codifica a APP, localizado no cromossomo 21, com várias mutações identificadas associadas à DA. Entretanto acredita-se que essas mutações correspondem a menos de 1% do total de casos da doença de Alzheimer (Lambert e Amouyel, 2007). Essas mutações no gene de APP aumentam os níveis de A β (Jankowky et al., 2004). Além

dessas mutações isoladas a duplicação no gene de *APP* também é uma herança autossômica dominante (Royelet-Lecrux et al., 2006). Essa observação implica que o aumento substancial na expressão desse gene é suficiente para causar DA. Outras pesquisas com finalidade de detectar mutações no promotor do gene de *APP* também estão em andamento e indicam que a variação genética dentro do promotor pode modificar o risco de desenvolvimento de DA (Theuns et al., 2006).

A partir de um estudo sistemático ao longo de todos os cromossomos, identificou-se outro gene (cromossomo 14) em famílias com vários membros afetados por DA, cujos membros não apresentavam as recém-descobertas mutações na *APP*. Pouco depois descobriu-se que esse novo gene, presenilina-1 (PS1), codifica uma proteína de membrana de 467 aminoácidos. Já foram identificadas pelo menos 155 mutações na *PS1* associadas à DA (<http://www.alzforum.org/res/com/mut/ps1>). Estima-se que esse gene seja responsável por mais de 50% das DA do tipo mendeliano, o que corresponde a aproximadamente 4% de todos os casos de pacientes com DA. De acordo com a literatura a PS1 participa na função catalítica do complexo G-secretase e suas mutações induzem um relativo aumento na produção de A β (Wolfe et al., 1999).

Logo após a identificação da sequência de DNA do gene *PS1*, alguns grupos procuraram ao longo dos cromossomos outros loci que apresentassem semelhança à sequência de nucleotídeos do *PS1*. Através dessa estratégia, outro gene foi identificado no cromossomo 1 e chamado de presenilina-2 (PS2). O produto desse gene também é uma proteína de membrana composta por 448 aminoácidos apresentando alta similaridade (67%) protéica com a PS1. Até o momento, apenas nove mutações foram identificadas na *PS2* e associadas à DA (<http://www.alzforum.org/res/com/mut/ps2>). Algumas mutações em *PS2*, tal como em *PS1*, também foram associadas ao aumento na produção de A β . Entretanto, estudos *in vitro* revelaram que quatro dessas mutações não alteram a produção de A β . Deste modo, tem sido especulado que essas mutações podem ser apenas polimorfismos raros ao invés de mutações causais da doença (Walker et al., 2005). Acredita-se que mutações neste gene sejam responsáveis por um pequeno número de casos de DA (Sandbrink et al., 1996).

Desde 1934, tem sido sugerido que algumas formas de DA são determinadas puramente pela genética e herdada por herança autossômica dominante (Lowenberg e Waggoner, 1934). No entanto, apenas na década de 80 esses genes envolvidos foram caracterizados sistematicamente por avanços metodológicos. E apesar da diversidade genética, essas formas determinam menos de 1% dos casos de DA (Campion et al., 1999). Na grande maioria das vezes, a doença tem início

após os 65 anos de idade e seus mecanismos etiopatogênicos incluem determinantes genéticos mais complexos, além de fatores ambientais e aqueles relacionados ao envelhecimento.

- DA do tipo tardio

Investigações em famílias com membros afetados por DA do tipo tardio (>65 anos) indicaram a presença de um locus no cromossomo 19 associado com a doença (Pericak-Vance et al., 1991). Mais tarde identificou-se esse gene como o codificador da apolipoproteína do tipo E (ApoE), uma glicoproteína com 317 aminoácidos, que participa da modulação do metabolismo e excreção do colesterol e outras lipoproteínas de baixa densidade (LDL e VLDL). ApoE é uma das principais proteínas presentes no plasma humano, para onde é exportada após sua síntese no fígado (Lin et al., 1986; Elshourbagy et al., 1985), além de ser a principal apolipoproteína encontrada no cérebro. No plasma, a ApoE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de um grupo de lipoproteínas de alta densidade (HDL), envolvida na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diferentes tecidos (Mensenkamp et al., 1999)

Estudos sobre os efeitos do colesterol no processamento da APP mostraram uma redução na forma solúvel resultado da clivagem por alfa-secretase em APP (Bodovitz e Klien, 1996). Mais ainda, modelos animais da doença Niemann-Pick tipo C, que acumula colesterol em endossomos/lisossomos e apresenta ApoE elevada, apresentaram níveis de A β aumentado (Burns et al., 2003).

O gene de *ApoE* apresenta três alelos comuns designados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, que diferem entre si apenas pela permuta de dois aminoácidos nas posições 112 e 158 (Saunders et al., 1993). O alelo $\epsilon 3$ é o mais comum (77-78%) na população em geral, enquanto que o alelo $\epsilon 2$ é o menos freqüente (encontrado entre 7-8% na população em geral) e o alelo $\epsilon 4$ é intermediário, estando presente em 14-16% dos indivíduos (Cedazo-Mínguez, 2007). Vários estudos têm demonstrado que a presença de apenas um alelo $\epsilon 4$ da *ApoE* aumenta o risco de um indivíduo desenvolver a DA em três a quatro vezes, quando comparado com o risco na população geral. O risco para um indivíduo que carrega os dois alelos $\epsilon 4$ poderá ser de oito até 14 vezes maior quando comparado com os indivíduos $\epsilon 3/\epsilon 3$. Observações preliminares têm também associado o alelo $\epsilon 4$ da *ApoE* a manifestações mais precoces da doença nos indivíduos que apresentam também mutações nos genes descritos anteriormente, particularmente *APP* e a *PS2* (Ashford, 2004).

Existem ainda evidências de que a ApoE seria um dos componentes das placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (Schmechel et al., 1993). Alguns estudos mostram que os níveis de

A β são elevados no cérebro dos pacientes com DA que carregam o alelo $\epsilon 4$ de ApoE (Cedazo-Mínguez, 2007). A *ApoE $\epsilon 4$* promove a fibrilogênese *in vivo* e *in vitro* do peptídeo A β e a *ApoE $\epsilon 3$* liga-se a proteína tau, diminuindo a sua taxa inicial de fosforilação e a formação de filamentos (Corder et al., 1998; Czyzewski et al., 1998).

Achados similares foram observados em estudos com camundongos transgênicos que expressavam as isoformas de *ApoE* (Dolev e Michaelson, 2004 e Hartman et al., 2002). Os estudos com camundongos transgênicos para o gene *APP* sugerem que a ApoE contribui para o depósito de A β , sendo este depósito mais severo na presença da isoforma $\epsilon 4$. A interrupção do gene *ApoE* em camundongos nocaute inibiu a deposição da A β (Bales et al., 1997) e essa ausência de *ApoE* afetou o acúmulo extracelular da A β , mas não a sua síntese (Bales et al., 1999).

Muitos estudos mostraram diferenças na ligação entre ApoE $\epsilon 4$ e ApoE $\epsilon 3$ com a deposição de A β , entretanto os mecanismos que implicam em ApoE $\epsilon 4$ na facilitação desta deposição ainda não foram elucidados. Existem dois modelos que tentam explicar o papel da ApoE no acúmulo da A β : no primeiro, a A β solúvel interagiria com a ApoE associada a uma partícula lipídica, seguindo para a endocitose mediada por receptor. As lipoproteínas são então digeridas enzimaticamente no compartimento lisossômico, liberando o colesterol para a célula. Nos lisossomos, uma fração de ApoE-A β é degradada, enquanto o restante da ApoE permanece associada à A β e promove a sua agregação em fibrilas amilóides que são secretadas de volta para o meio extra-celular. Dado que a ApoE $\epsilon 4$ tem uma afinidade maior pela A β do que pelas demais isoformas, pode ser esperada uma aceleração nesse processo. No segundo modelo, além de facilitar diretamente a entrada da A β na célula e a sua agregação, a ApoE poderia também aumentar a taxa de produção de A β , através do aumento do colesterol celular. Após a endocitose mediada por um receptor e a digestão enzimática das lipoproteínas, o colesterol é liberado para as membranas celulares. As lipoproteínas ApoE $\epsilon 4$ tendem a conter mais colesterol, e o aumento do conteúdo de esterol nas membranas intracelulares promoveria um aumento na taxa de geração de A β , resultando em uma liberação maior para o meio extracelular (revisão em Puglielli et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais o status do gene de *ApoE* de um indivíduo afetaria o risco de DA ainda não são totalmente conhecidos. Isso se deve ao fato de que mais de 50% dos pacientes com DA do tipo tardio não possuem o alelo $\epsilon 4$ e cerca de 20% dos portadores do alelo $\epsilon 4$ não desenvolvem DA (Khachaturian et al., 2004), sendo assim a genotipagem não é recomendada para predição de risco da doença.

Os estudos de associação são baseados na comparação da frequência das variações genéticas entre amostras de famílias ou pacientes esporádicos e a amostra de controles. Se a distribuição alélica e genotípica diferir significativamente entre essas duas populações, o gene ou o locus contendo a variação é considerado associado ao risco de desenvolvimento de DA. O uso de estudos de associação pode ser muito efetivo na detecção dos efeitos das interações (genéticos e/ou ambientais) no risco de desenvolver uma doença. Entretanto essa abordagem apresenta muitos problemas relacionados a seleção dos genes a serem estudados, a qualidade e tamanho da população, e funcionalmente na associação de polimorfismos. Dessa forma, embora quase 200 genes já tenham sido propostos como determinantes genéticos para DA (que representa mais de 800 publicações desde 1993), nenhum consenso foi definitivamente encontrado a respeito desses genes, dado a inconsistência de associações entre as populações independentes observadas (revisto em Lambert e Amoyel, 2007). De fato, a proliferação de estudos de associação (com pequenas populações de menos de 100 casos e controles) resultou em achados numerosos de associação (possivelmente resultados falso-positivos). Inversamente, o baixo poder estatístico associado a esses estudos pequenos de associação guiaram também a rejeição de genes relevantes devido aos resultados falso-negativos. Conseqüentemente, os achados dos estudos de associação têm perdido um pouco da sua credibilidade.

1.1.4 Vias metabólicas envolvidas com a doença de Alzheimer

O gene da *APP* foi mapeado na região centromérica do cromossomo 21 (Kang et al., 1987), e contém 19 exons. Este gene codifica uma glicoproteína integral da membrana plasmática que contém uma porção citoplasmática C-terminal curta correspondente à sequência do peptídeo A β , codificado por parte dos exons 16 e 17, além de um longo domínio N-terminal extracelular. Camundongos *knockout* para *APP* foram gerados e mostraram-se viáveis e férteis. Entretanto, com uma observação mais minuciosa, foi possível observar que eles exibiam discretas diferenças em relação aos camundongos normais, apresentando baixo peso, redução da atividade motora, e uma inesperada gliose (Zheng et al., 1995), que sugere um importante papel da APP ou de seus produtos proteolíticos.

Pelo menos três enzimas, conhecidas como secretases, denominadas alfa, beta e gama-secretases, são implicadas na proteólise da APP e posterior liberação do peptídeo A β (Lemaire et al., 1989). Os primeiros resíduos de 28 aminoácidos do peptídeo A β são originados do domínio extracelular de APP, enquanto que os resíduos restantes de 11 a 15 vêm da região

transmembrana. O peptídeo A β é liberado após a clivagem na posição 597 e 637 a 639 pela beta e gama-secretase, respectivamente (Younkin, 1998; Selkoe, 2001a,b).

O local de clivagem pela alfa-secretase parece ser regulado pela atividade da proteína quinase C (PKC) (Jacobsen et al., 1994); alguns receptores de acetilcolina sinalizam através da PKC. Drogas que atuam como agonistas M1 desenvolvidas como agentes terapêuticos sintomáticos para a DA alteram o metabolismo APP em células transfectadas, em fibroblastos cutâneos de pacientes com DA e em neurônios (Wolf et al., 1995). O aumento da atividade da alfa-secretase ocasiona aumento do metabolismo secretor da APP e diminuição correspondente na produção de amiloide. Conseqüentemente, a perda de projeções colinérgicas resultaria, hipoteticamente, em aumento na produção de amiloide. Experimentos através da produção de lesões em ratos visando mimetizar a perda de fibras colinérgicas resultaram, de fato, em um aumento de fragmentos metabólicos amiloidogênicos de APP como pôde ser observado em experimentos em culturas celulares. Ainda mais, nestes modelos de DA, inibidores da acetilcolinesterase reverteram a anormalidade no metabolismo da APP (Haroutunian et al, 1997).

Contrastando com o metabolismo da APP promovido pela alfa-secretase, a clivagem via beta-secretase origina fragmentos que contêm o peptídeo A β . Estes são ulteriormente metabolizados, provavelmente através da via endossomal/lisossomal da gama-secretase que cliva na porção C-terminal em diferentes locais, gerando peptídeo A β de 39 a 43 aminoácidos. As duas formas mais comuns são os peptídeos de 40 e 42 resíduos (A β 40 e A β 42, respectivamente). Em indivíduos normais, a grande maioria de A β produzido ocorre na sua forma mais curta, ou seja, prevalência de A β 40 (Younkin, 1998) e cerca de 5-15% do total de A β 42 (Findeis, 2007). Animais transgênicos que expressam A β 40 ou A β 42 na ausência de superexpressão de APP foram desenvolvidos (McGowan et al., 2005). Os camundongos transgênicos que expressavam altos níveis de A β 40 não desenvolveram patologia amiloide óbvia. Em contraste, os camundongos com baixos níveis de A β 42 acumularam A β 42 em sua forma insolúvel e formaram as placas senis. Quando camundongos que expressavam A β 42 foram cruzados com camundongos mutantes de APP (Tg2576), houve um grande aumento na deposição de amiloide.

Estas formas mais longas destes peptídeos amilóides denominadas A β 42 apresentam maior capacidade de agregação e provavelmente são mais neurotóxicas e, portanto, patogênicas (Kowall, 1994). Altos níveis de A β 42 no plasma são correlacionados com aumento no risco de DA e esses níveis diminuem gradualmente ao longo do tempo em pacientes diagnosticados precocemente (Mayeux et al., 2003). Essa redução dos níveis de A β 42 no plasma, seguida da

progressão inicial da doença é consistente com a concepção de um acúmulo acelerado de A β 42 que se deposita progressivamente nos neurônios em paralelo com o avanço da doença (Findeis, 2007). A β 42 também foi encontrado em níveis elevados nos músculos de pacientes com DA (Kuo et al, 2000). Não se conhece ao certo o mecanismo através do qual o material amilóide exerce efeito neurotóxico, embora existam algumas evidências sugestivas da ocorrência de um efeito mediado pela formação de radicais livres (Pike et al., 1997) ou, alternativamente, através de um efeito inflamatório (Kaltschmidt et al., 1997). Existem ainda outras hipóteses sobre a quebra da homeostase intracelular do cálcio, potássio, indução de estresse oxidativo bem como aumento da Bax e p53 (Zhang et al., 2002), pró-apoptótica, simultaneamente com o decréscimo da Bcl-2, neuroprotetora (revisão em Wei et al., 2000).

A outra lesão patogênica característica da DA é a presença dos emaranhados neurofibrilares. Estas estruturas intraneuronais são compostas por filamentos helicoidais pareados, que se agregam em proteína Tau altamente fosforilada (revisto por Lovestone e Reynolds, 1997). Comparativamente aos controles, o nível de Tau no líquido é aumentado em cerca de 300% em pacientes com DA, provavelmente como resultado da degeneração neuronal e axonal (Blennow, 2004). Em uma série de estudos foi demonstrada a sequência de eventos implicados na patogênese da DA sendo que os sinais mais precocemente observados consistem do aumento da fosforilação da proteína Tau seguido da formação de emaranhados neurofibrilares, particularmente observados no córtex transentorrinal (Braak e Braak, 1990).

Através de uma série de estudos *in vitro*, foi verificado que algumas quinases (como GSK3b e CDK5) e fosfatases (PP-1 e PP-2A) são capazes de fosforilar Tau (Iqbal et al., 2005). Surpreendentemente, há poucas relações consistentemente observadas entre a deposição de amilóide e a fosforilação da proteína Tau ainda que existam evidências de que esta relação deva ocorrer, uma vez que as duas lesões neuropatológicas são encontradas conjuntamente em todos os casos de DA. Foi demonstrado que a aplicação de material amilóide em neurônios em cultura induz aumento da fosforilação da proteína Tau (Le et al., 1997) e que a redução da atividade da GSK3 através da introdução de oligonucleotídeos *antisense* abole o efeito patogênico do material amilóide (Takashima et al., 1993). Deste modo, a GSK3 talvez represente o elo perdido entre os emaranhados neurofibrilares e as placas senis.

1.2 GSK3

A glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) foi descoberta há mais de 20 anos, sendo identificada como uma das muitas proteínas quinases que fosforilam e inativam a glicogênio

sintase, uma enzima terminal na biosíntese do glicogênio. Especificamente, a insulina estimula a inativação de GSK3 por fosforilação indiretamente afetando a distribuição da glicogênio sintase (Aghdam e Barger, 2006). GSK3 foi subsequentemente purificada de músculo esquelético e a sua caracterização molecular revelou a existência de duas isoformas, denominadas GSK3a e GSK3b, vastamente expressas em mamíferos. As proteínas compartilham de 97% de similaridade em seus domínios catalíticos, porém diferem significativamente fora destes (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática de GSK3a e GSK3b de mamíferos.

Fonte: Doble & Woodgett, 2003.

Apesar de GSK3 ser tradicionalmente considerada uma proteína citosólica (onde é predominantemente encontrada), ela também é encontrada no núcleo celular e em mitocôndrias, onde está altamente ativada quando comparada à GSK3 citosólica (Dudek et al., 1997). A GSK3 nuclear é importante devido à sua capacidade de regular vários fatores de transcrição, permitindo deste modo o controle de muitas vias de sinalização e, em última instância, a regulação da expressão de vários genes. Os níveis nucleares de GSK3 não são estáticos, e mudam dinamicamente em resposta a sinais intracelulares. Esses níveis podem aumentar rapidamente durante a apoptose, permitindo que a GSK3 possa modular a expressão de genes relacionados a esse processo, através da regulação de fatores de transcrição (Bhat et al., 2000). No sistema nervoso central de ratos, a GSK3b é encontrada no final da fase embrionária e permanece no seu pico máximo por alguns dias após o nascimento (Leroy e Brion, 1999). Esse nível declina progressivamente com a idade, mas quando comparado a outros tecidos, a expressão cerebral de GSK3b permanece alta mesmo em adultos (Lau et al., 1999). Neurônios ao contrário de astrócitos expressam GSK3b (Leroy e Brion, 1999).

Essa quinase, constitutivamente ativa, é regulada negativamente pela fosforilação de resíduos de serina, Ser21 (GSK3a) e Ser9 (GSK3b), do domínio regulatório amino-terminal (Frame e Cohen, 2001). A proteína AKT/proteína quinase B (PKB) mostrou-se capaz de inibir as duas isoformas de GSK3 (Cross et al., 1995), essa habilidade de AKT fosforilar GSK3 é

fascinante diante do proeminente papel de AKT nas vias de sinalização em neuroproteção. Entretanto, outras proteínas quinases tais como proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) podem também regular GSK3 em diferentes sistemas celulares (Frame e Cohen, 2001).

Atualmente sabe-se que GSK3 é capaz de fosforilar um vasto número de substratos (mais de 50 já são conhecidos – revisto em Joper et al, 2007). Esses substratos fazem com que GSK3 influencie muitas funções celulares críticas, como expressão gênica, estrutura celular, plasticidade neuronal e sobrevivência. Deste modo, mecanismos regulatórios surgem para alterar seletivamente a atividade de GSK3. Já foi bem documentado que a inativação da GSK3 β , atua como um regulador positivo da via de WNT (Hedgepeth et al., 1997; Klein e Melton, 1996; Stambolik et al., 1996) (Figura 4). A via de sinalização de WNT é essencial no desenvolvimento e nos processos carcinogênicos (Patapoutian e Reichardt, 2000) e também em doenças neuropsiquiátricas como a esquizofrenia (Kozlovsky et al., 2002; Miyaoka et al., 1999) e a doença de Alzheimer (Caricasole et al., 2003; Mudher e Lovestone, 2002; De Ferrari e Inestrosa, 2000).

GSK3 é ativa em células em repouso e fosforila β -catenina que por sua vez é degradada pelo proteossomo. Quando há estímulo via WNT, a fosforilação de β -catenina por GSK3 é regulada negativamente. Isso promove um enriquecimento de β -catenina no citosol e núcleo, onde ela se liga aos fatores de transcrição T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/LEF) para aumentar a expressão dos genes alvos. Vários alvos de β -catenina na ativação transcricional já foram identificados. Dentre eles a ciclina D, um gene regulador de ciclo celular em mamíferos (Shtutman et al., 1999). Mutações pontuais em β -catenina que eliminam o sítio de fosforilação por meio de GSK3 são suficientes para estabilizar β -catenina nas células (Munemitsu et al., 1996; Yost et al., 1996; Aberle et al., 1997; Orford et al., 1997). Essas mutações foram encontradas em diferentes tipos de câncer e são fortemente correlacionadas com a elevação de β -catenina citoplasmática e nuclear *in vivo* (Peifer e Polakis, 2000; Polakis, 2000).

Figura 4 – Via de WNT que inibe GSK3 e promove acúmulo de β – catenina e a conseqüente ativação da transcrição de alguns genes.

Fonte: Doble & Woodgett, 2003.

Hoeflich e colaboradores (2000) geraram camundongos deficientes em GSK3 β . Embora camundongos *Gsk3b* +/- fossem saudáveis e férteis (tanto os machos quanto as fêmeas), a progênie *Gsk3b* -/- não se mostrou viável. A mortalidade embrionária ocorreu devido a uma degeneração severa do fígado, com um fenótipo consistente com o excesso de fator de necrose tumoral (*Tumoral necrose factor* - TNF). Em contrapartida, Lucas e colaboradores (2001) geraram camundongos que superexpressavam *GSK3b* no cérebro adulto. Esses camundongos apresentaram níveis diminuídos de β -catenina nuclear e hiperfosforilação da tau em neurônios hipocâmpais. Apresentaram também indicativos de estresse e morte neuronal.

A GSK3 tem um papel importante na hiperfosforilação da tau em neurônios (Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997). Esta fosforilação antecede a agregação e a conseqüente formação dos NFTs (Braak et al., 1994). Em neurônios, a fosforilação da proteína tau depende primariamente da atividade da GSK3 contrabalançada pela ação de diversas fosfatases (Hong et al., 1997, Muñoz-Montano et al., 1997). A modificação desse equilíbrio enzimático contribui para a patogenia da DA. Em estado defosforilado, a proteína tau tem a propriedade de estabilizar os polímeros de alfa e beta tubulina, constituintes unitários dos microtúbulos. A integridade do citoesqueleto é essencial, não apenas para a manutenção da estrutura neuronal, mas também para o transporte axonal. Admite-se que antes da degradação propriamente dita do citoesqueleto, que conduz ao seu colapso e à morte neuronal, já existe uma fase do processo patogênico em que o

transporte axonal encontra-se disfuncional, muito embora a estrutura microtubular ainda se encontre preservada (Caselli et al., 2006).

Embora GSK3b seja reconhecida como envolvida na fosforilação de tau, o seu papel no processamento do APP ainda é pouco compreendido. Porém especula-se que além da proteína tau, a GSK3b também seja capaz de fosforilar a APP, favorecendo a via amiloidogênica (Phiel et al., 2003). O peptídeo A β , por sua vez, favorece a fosforilação da tau (Busciglio et al., 1995, Le et al., 1997), impedindo sua ligação a tubulina, num efeito mediado pela GSK3b (Takashima et al., 1995).

As vias metabólicas que envolvem a GSK3b e a APP parecem estar inter-relacionadas. Muitos estudos mostraram que a produção de A β é promovida pela GSK3 e reduzida por inibidores de GSK3 (Phiel et al., 2003; Li et al., 2003; Su et al., 2004). Esse processo ainda precisa ser bastante esclarecido, mas especula-se que talvez esteja associado com a fosforilação já reportada de APP por GSK3 (Applin et al., 1997) ou com a ligação de GSK3 à PS1 (Takashima et al., 1998) uma vez que já foi mostrado que GSK3 fosforila e regula o processamento de PS1 (Kirschenbaum et al., 2001).

Inestrosa et al. (2002) e Alvarez et al. (1999) também sugeriram que a inibição de GSK3b protege os neurônios de ratos dos danos causados pela A β . Outros estudos mostraram que a β -catenina interage com a PS1 (Levesque et al., 1999; Yu et al., 1998), formando um complexo com GSK3b no cérebro humano normal e em neurônios (Tesko e Tanzi, 2000; Kang et al., 1999; Takashima et al., 1998). Zhang e colaboradores (1998) mostraram evidências de que os níveis de β -catenina estavam acentuadamente reduzidos no cérebro de pacientes com DA e com mutação em PS1. Adicionalmente, Alvarez e colaboradores (2004) demonstraram que a ativação da via WNT3A protege os neurônios hipocâmpais da apoptose induzida por A β . A modulação da expressão de WNT3A estava relacionada com uma diminuição ou aumento dos níveis citoplasmáticos de β -catenina após o tratamento com A β e WNT3A, respectivamente. Porém, os alvos metabólicos da ativação da via WNT/ β -catenina ainda precisam ser esclarecidos (Figura 5).

Figura 5 – Participação de GSK3 na formação das placas senis e dos NFTs.

Fonte: De Strooper & Woodgett, 2003.

A participação de GSK3 em vias importantes na patogênese da DA permite supor que a sua inibição possa ser um importante e efetivo alvo terapêutico, com reflexos em duas das principais vertentes da DA: a cascata do β -amilóide e a formação dos NFTs (Joje e Johnson, 2004).

1.3 Lítio

O lítio é um potente inibidor de GSK3 (Klein e Melton, 1996) atuando tanto sobre a GSK3a quanto sobre a GSK3b (Stambolic et al, 1996). Em concentrações terapêuticas (ao redor de 1mM), o lítio exerce inibição reversível da atividade de GSK3, por dois mecanismos independentes. A inibição direta da GSK3 pode ocorrer por meio da competição do lítio com os íons de magnésio, porém de forma não competitiva em relação ao ATP ou ao substrato (Ryves et al., 2002). Alternativamente, a inativação da GSK3 pelo lítio pode ocorrer por mecanismo indireto, dependente da transdução de sinais pelas vias da insulina e PKB/AKT ou da PLC/PKC/MAPK, resultando na fosforilação e consequente inibição da GSK3b (Lovestone et al., 1999). Assim, a concepção de lítio como inibidor de GSK3 permite assumir que em níveis terapêuticos esta droga possa inibir moderadamente a GSK3. É interessante notar que o lítio em

concentrações de 1mM diminui, mas não suprime a atividade de GSK3. Esta parece ser uma maneira adequada deste conhecido estabilizador de humor agir, diminuindo a amplitude dos sinais sem bloquear os mecanismos mais críticos de sinalização (revisão em Gimes e Joep, 2001).

Por causa da importância dos efeitos inibitórios de lítio sobre GSK3 no tratamento de transtorno bipolar e por causa do potencial envolvimento de GSK3 em outras doenças, como DA e diabetes, muitos esforços recentes estão sendo focados na descoberta de inibidores de GSK3 e muitos deles já foram identificados (Conde et al., 2003; Alonso e Martinez, 2004). É igualmente possível que a inibição de GSK3 por lítio também afete outros eventos, tais como alterações na transcrição gênica, sobrevivência celular, atividade sináptica, plasticidade celular e várias outras. No entanto ainda estamos no começo do entendimento das funções e ramificações de GSK3 e dos efeitos de sua inibição por lítio, e muito ainda falta ser elucidado até chegarmos aos efeitos terapêuticos do lítio.

Nas concentrações séricas utilizadas para tratamento clínico, o lítio leva à diminuição da hiperfosforilação da tau (Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997; Joep, 1999). A inibição da GSK3 pelo cloreto de lítio determinou a redução do grau de fosforilação da tau em culturas primárias de neurônios e em células não-neuronais transfectadas (Hong et al., 1997; Lovestone et al., 1999; Tatebayashi et al., 1999). Mais recentemente, demonstrou-se em culturas organotípicas de fatias hipocâmpais, que a ativação da GSK3b, por meio de drogas inibidoras da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (P13K) e da PKC, promove o acúmulo de formas hiperfosforiladas da tau, que se encontram tipicamente na DA (Li et al., 2006). Neste estudo o tratamento com cloreto de lítio reverteu a hiperfosforilação da tau (Li et al., 2006). Ratos transgênicos que super-expressam a *Gsk3b* apresentam maior hiperfosforilação da tau e neurônios apoptóticos. Por outro lado, ratos transgênicos que expressam de forma aumentada a tau, tratados com lítio ou outros inibidores da GSK3 tiveram uma diminuição da presença de tau e sua conseqüente degeneração axonal (Noble et al., 2005).

Em *Drosophila*, a GSK3b corresponde à denominação *shaggy*, que também pertence ao sistema de sinalização WNT. A expressão e a atividade da GSK3b determinam o fenótipo *wingless*. Em modelos desenvolvidos a partir de larvas de *Drosophila* geneticamente modificadas, mostrou-se que a hiper-expressão da isoforma 0N3R da tau humana compromete o transporte axonal em neurônios motores, causando a agregação das vesículas de transporte e, conseqüentemente, a perda da função locomotora. Esse efeito é ainda mais pronunciado na presença de GSK3b constitutivamente ativa. Na presença de lítio e outros inibidores da GSK3b, a eficiência do transporte axonal e o fenótipo locomotor são restabelecidos, sugerindo que tais efeitos são

dependentes da fosforilação da tau (Mudher et al., 2004). Esse processo parece ainda estar relacionado aos mecanismos de formação da memória. A potenciação de longo termo (LTP) encontra-se comprometida em camundongos transgênicos que hiper-expressam tau e GSK3b. Nesses animais, o tratamento com lítio em concentrações terapêuticas restabeleceu os parâmetros normais de LTP (Lovestone et al., 2005).

1.3.1 Lítio como tratamento no Transtorno Afetivo Bipolar

Lítio é o medicamento de primeira escolha para o tratamento dos episódios maníacos e também para a subsequente terapêutica de manutenção no Transtorno Afetivo Bipolar (TAB). Apesar de existirem outras opções terapêuticas eficazes, ainda não foram produzidas evidências da superioridade destes fármacos em relação ao lítio (Shulman et al., 2003).

Lítio geralmente apresenta um efeito benéfico em aproximadamente 60-80% dos pacientes, com poucos registros de desenvolvimento de tolerância ou perda de sensibilidade mesmo após vários anos de tratamento (Joje, 1999; Phiel e Klein, 2001). Por ser uma medicação utilizada na psiquiatria há mais de 50 anos a lítio terapia tem seus efeitos terapêuticos e colaterais muito bem conhecidos. Em adultos, quando utilizado em níveis terapêuticos, o lítio pode gerar efeitos colaterais tais como exacerbação de psoríase, indução de hipotireoidismo, ganho ou redução de peso, poliúria e tremor. Alterações cognitivas são queixas comuns em pacientes tomando lítio para o tratamento do TAB e, em alguns casos, podem ser responsáveis pela má aderência ao tratamento. Em uma revisão das publicações entre 1968 e 2000, os possíveis efeitos encontrados incluem discretas diminuições na velocidade de processos mentais e memória verbal, sendo que não foram observadas alterações em habilidades visoespaciais, atenção, concentração ou efeito cumulativo negativo (Pachet e Wisniewski, 2003). Em um dos poucos estudos longitudinais prospectivos de uma coorte de 18 pacientes adultos tratados com lítio e observados por seis anos, foi encontrado um desempenho neurocognitivo estável (Engelsmann et al., 1988).

O lítio possui uma pequena janela terapêutica e os níveis séricos devem ser cautelosamente monitorados. Lítio é um sal altamente solúvel em água, não é metabolizado e sua eliminação se faz pelos rins. De forma geral, por possuírem uma menor depuração renal, além de menor quantidade de água corporal e reduzida massa muscular, os indivíduos idosos necessitam de doses menores de lítio (25-50%) para alcançar as mesmas concentrações séricas (Sproule et al., 2000). Ainda existem divergências quanto à litemia ideal para idosos, alguns estudos demonstram boas respostas (Fahy e Lawlor, 2001) e melhor tolerabilidade (Sproule et al., 2000) abaixo do

limite inferior, outros sugerem que as litemias devem seguir os valores preconizados para os adultos: 0,8 a 1,2mEq/L (Eastham et al., 1998).

Quando GSK3 foi relacionada ao TAB por meio dos achados de inibição dessa enzima por lítio, os resultados mostravam que GSK3 era inibida com IC50 de aproximadamente 2mM, um pouco maior que a concentração terapêutica de lítio encontrada no soro, que é de aproximadamente 0,5 - 1,5mM (Klein e Melton, 1996). Dessa forma, mesmo com outros resultados posteriores de inibição de GSK3 por lítio em células (Stambolic et al., 1996) e em cérebro de mamíferos (Munoz-Montano, 1997), pode-se pensar que a efetividade da concentração terapêutica de lítio sendo abaixo da descrita para inibir GSK3 em quase nada contribui para a estabilização de humor em TAB. Entretanto com as descobertas de estudos posteriores *in vivo*, mostraram que o tratamento crônico (4 semanas) com lítio em doses terapêuticas foi capaz de aumentar em sete vezes a fosforilação no resíduo de serina-9 de GSK3b de algumas regiões cerebrais de camundongos (De Sarno e Jope, 2002). Assim, esses resultados levaram ao panorama de que os efeitos de lítio sobre GSK3 podem ser amplificados por meio de seus mecanismos de fosforilação.

Outras terapias usadas para TAB também foram relacionadas à atividade de GSK-3. O ácido valpróico, originalmente um anticonvulsivante e amplamente usado como estabilizador de humor em TAB, foi demonstrado como capaz de inibir diretamente a atividade de GSK3 (Kim et al., 2005), algo que não havia sido demonstrado anteriormente (Phiel et al., 2001). Em resumo a conexão entre GSK3 e seu efeito terapêutico por meio da sua inibição devem ser cautelosamente interpretados e deve-se evitar assumir que GSK3 possa estar hiperativa em TAB. Entretanto existe a possibilidade de que no TAB existam alterações *downstream* ou *upstream* a GSK3.

Embora muito se tenha aprendido sobre os efeitos inibitórios de lítio sobre GSK3 e sobre a sua ação em células, muitas questões sobre a relação entre a inibição de GSK3 e a estabilização do humor, como efeito terapêutico do lítio no tratamento de TAB, ainda devem ser elucidadas. Mais ainda, falta avaliar primeiramente qual ação de GSK3 inibida por lítio que se torna crítica para a terapêutica de TAB. Essas e outras questões encontram dificuldades para serem respondidas experimentalmente, já que a maioria das evidências são baseadas na correlação de resultados. Por exemplo, lítio inibe GSK3 em cérebro de camundongos (De Sarno et al., 2002) e em células sanguíneas humanas (Li et al., 2006), sugerindo que este sal também possa inibir a GSK3 no cérebro humano.

1.3.2 Lítio e neuroproteção

Uma série de evidências existentes aponta para o envolvimento de GSK3 com processos neuronais de apoptose e neurodegeneração. Os exemplos surgem desde a apoptose fisiológica que ocorre durante o desenvolvimento quanto a apoptose indesejada causada por danos como acidentes vasculares e outros tipos de isquemia. As implicações da manipulação farmacológica associadas ao lítio refletem em aumento de volume de áreas de massa cinzenta em TAB, um efeito relacionado às propriedades de neuroproteção do lítio (Moore et al., 2000).

No que diz respeito à via de WNT, como já dito anteriormente, a supressão da fosforilação de β -catenina por GSK3, faz com que β -catenina aumente a transcrição de genes de sobrevivência e iniba a expressão de genes pró-apoptóticos (Aghdam e Barger, 2006). Já que lítio inibe GSK-3, exercendo um papel substituto ao WNT, pode também aumentar a translocação nuclear de β -catenina (Lucas e Salinas, 1997). O efeito dominante de GSK3 na morte neuronal foi demonstrado por meio da super-expressão de GSK3 em linhagens celulares de neuroblastoma humano, que levaram essas células a apresentarem efeitos pró-apoptóticos (Bijur et al., 2000). Similarmente, outro estudo mostrou que a super-expressão de GSK3 resulta em clara neurodegeneração (Lucas et al., 2001). Certamente o lítio poderia reverter os efeitos apoptóticos de GSK3 (Bijur et al., 2000).

O uso crônico do lítio, em concentrações baixas (0,3 mM), aumenta substancialmente a expressão da Bcl-2, uma importante proteína citoprotetora no sistema nervoso central (SNC), tanto em córtex de rato quanto em células humanas de origem neuronal (Aghdam e Barger, 2006). Além de ações neuroprotetoras, a Bcl-2 parece auxiliar na regeneração de axônios no SNC de mamíferos (revisão em Manji et al., 2000). Em modelos animais, uso crônico do lítio reduziu dano isquêmico (Nonaka e Chuang, 1998). Esse mesmo tipo de exposição inibe a expressão de genes pró-apoptóticos tais como p53 (Chen e Chuang, 1999; Lu et al., 1999) e Bax, e aumenta de genes citoprotetores tais como Bcl-2 (Chen et al., 1999; Chen e Chuang, 1999). Neurônios em cultura, expostos a doses terapêuticas do lítio por pelo menos sete dias, ficam protegidos da apoptose induzida por glutamato de forma mais duradoura, suprimindo o influxo de cálcio decorrente da estimulação dos receptores de N-metil-D-aspartato (Nonaka et al., 1998). Tal efeito pode decorrer da ativação da serina-treonina quinase AKT1, suprimindo a inibição da mesma pelo glutamato (Chalecka-Franaszek e Chuang, 1999).

As evidências de uma ação neurotrófica do lítio são mais recentes (Manji et al., 2001b). Em ratos, o uso do lítio em doses terapêuticas proporcionou um aumento de neurogênese no giro denteado do hipocampo (Chen et al., 2000). Em um estudo com 10 pacientes com TAB,

oito deles obtiveram um aumento significativo do conteúdo de substância cinzenta após quatro semanas de tratamento com lítio, na concentração média de 0,8 mEq/L, sem que houvessem mudanças na composição da substância branca ou do conteúdo de água do cérebro (Moore et al., 2000a). Outras evidências das ações neurotróficas do lítio no cérebro humano vêm do estudo do N-acetil-aspartato através de espectroscopia por ressonância magnética. O N-acetil-aspartato é um marcador da viabilidade e função neuronal e está localizado primariamente nos neuritos (e não nos corpos celulares). Da mesma forma, após quatro semanas de tratamento com lítio, houve aumento de N-acetil-aspartato na substância cinzenta (Moore et al., 2000b).

Os mecanismos moleculares subjacentes à ação do lítio em neurônios não são totalmente conhecidos, mas certamente decorrem da atuação em mais de um substrato celular, afetando múltiplos pontos da transdução de sinais. O mecanismo mais conhecido consiste na inibição da inositol-monofosfatase (IMPase), o que impede a geração de inositol-1,4,5-trifosfato (INP3) e conduz à depleção dos estoques de inositol. Desse modo, o lítio bloqueia a resposta aos estímulos extracelulares dependentes da atividade enzimática da fosfolipase C (PLC) (Atack et al., 1993; Manji et al., 1995). Em conjunto, a ação do lítio sobre múltiplos sistemas de sinalização intracelular confere, *in vitro* e *in vivo*, efeitos neuroprotetores contra agressões de diferentes naturezas.

1.3.3 Lítio e doença de Alzheimer

A partir de modelos laboratoriais baseados em estudos com culturas de células e animais transgênicos, produziram-se evidências consistentes de que o lítio, através da inibição da GSK3, pode exercer ação duplamente favorável sobre as duas principais vias patogênicas da doença de Alzheimer: a cascata do β -amilóide e a formação dos NFTs (Jope e Johnson, 2004). GSK3 parece promover muitas das etapas principais do processo patológico de DA.

O peptídeo A β se liga e/ou ativa GSK3, indicando múltiplos pontos de contato entre GSK3 e o metabolismo de APP (Akiyama et al., 2005; Ryan e Pimplikar, 2005). GSK3 não apenas se envolve intimamente em muitos aspectos do metabolismo da APP e produção de A β , mas contribui também para a indução da toxicidade causada por A β (Fuentealba et al., 2004). O tratamento com A β ativa GSK3 em várias condições, indicando uma ligação direta entre a produção de A β e ativação de GSK3 e neurotoxicidade (Takashima et al., 1996; Magrane et al., 2005). Assim essas interações entre A β e GSK3 sugerem que os inibidores de GSK3 podem ser

terapêuticos, e isso foi demonstrado em modelos animais transgênicos de DA onde a administração de inibidores de GSK3 foi capaz de reduzir a quantidade de A β (Su et al., 2004).

Mais ainda, GSK3 pode fosforilar vários sítios de tau, e alguns desses são os mesmos sítios que estão anormalmente hiperfosforilados no cérebro de pacientes com DA (ver revisão em Jope et al., 2007). Por impedir que tau se ligue aos microtúbulos a ação de GSK3 pode ter impacto na estrutura e plasticidade neuronal, podendo levar a uma localização anormal e/ou acúmulo de tau, e talvez possa contribuir para a agregação de tau e eventual formação de NFTs. GSK3 pode ainda regular o *splicing* de tau (Hernandez et al, 2004), e sendo a hiperfosforilação de tau neurotóxica (Fath et al., 2002) a inibição de GSK3 protege as células de agregar tau induzindo a neurotoxicidade (Noble et al., 2005). Além do mais, a fosforilação de tau é aumentada em camundongos transgênicos que superexpressam GSK3b (Lucas et al., 2001). Dessa forma, GSK3 pode contribuir para a hiperfosforilação anormal de tau, que é o maior componente dos NFTs em cérebro de DA, que promove a agregação de tau e neurotoxicidade.

Apesar dessas inúmeras evidências dos efeitos dos inibidores de GSK3 na DA apenas nos dias de hoje começamos a perceber as primeiras evidências clínicas que comprovam que esse benefício hipotético seja aplicável aos seres humanos. Em um estudo clínico-epidemiológico realizado em nosso laboratório, com uma casuística de 120 pacientes idosos portadores do TAB observou-se que o tratamento com lítio, distintamente dos demais estabilizadores do humor, está associado a uma menor prevalência de demência e DA (Nunes et al., 2007).

Nesta população, a exposição ao lítio foi definida pelo uso regular do carbonato de lítio por pelo menos seis meses antes da avaliação, sendo que o tempo médio de exposição ao lítio foi de 6,2 anos, com uma litemia média ao longo dos anos de tratamento igual a 0,77mEq/L. Neste grupo amostral, a idade mais avançada e a exposição ao lítio foram as variáveis mais fortemente associadas ao desfecho cognitivo, conforme observado por análise multivariada, controlando-se as possíveis variáveis de confusão: idade ($p=0,005$), anos de evolução do TAB ($p=0,029$), número de internações/anos ($p=0,072$), número de episódios depressivos ($p=0,052$), uso de carbamazepina ($p=0,098$), uso de antidepressivo ($p=0,089$) e uso lítio ($p<0,001$) (Nunes et al., 2007).

A associação entre cada variável acima e a chance de desenvolvimento de DA em relação ao grupo normal, assim como a chance ocorrência de Transtorno Cognitivo Leve (TCL) em relação ao grupo normal, foi verificada por meio de regressão logística politômica. Permaneceram dentro dos limites de significância estatística as variáveis: idade ($p=0,025$) e uso lítio ($p<0,001$). O uso do lítio mostrou-se associado a uma menor probabilidade de DA em relação ao grupo de

bipolares sem déficit cognitivo, com razão de risco (OR) de 0,083 com intervalo de confiança de 95% entre 0,021 e 0,337 ($p < 0,001$). Como esperado, a idade mais avançada também se mostrou associada a um risco aumentado de DA, com OR de 1,18 e intervalo de confiança de 95% entre 1,034 e 1,340 ($p = 0,014$). (Nunes et al., 2007).

Portanto, o uso de lítio parece ter um efeito protetor em relação ao desenvolvimento da DA. Por ser um inibidor de GSK3, é tentador imaginar que o efeito protetor observado possa advir de uma inibição desta via. Mais tentador ainda, é especular sobre o uso de lítio em baixas concentrações (sub-terapêuticas) como terapia preventiva para a DA e outras tauopatias. Resta, porém, aprofundar o estudo do seu espectro de ação, para que possamos conhecer melhor os mecanismos utilizados na lítio-terapia.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do lítio sobre o transcriptoma e o proteoma de neurônios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) avaliar a expressão de genes relacionados à GSK3 e via de WNT após o tratamento com lítio;
- ii) avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo do β -amilóide mediante ao tratamento com lítio;
- iii) avaliar os efeitos do lítio sobre a expressão gênica diferencial utilizando a técnica de RaSH;
- iv) avaliar os efeitos do lítio sobre o proteoma de neurônios hipocampus em cultura.

CAPÍTULO 1 - LÍTIO E EXPRESSÃO DE GSK3

Em contraste com o grande volume de informações disponíveis a respeito do papel regulatório do lítio sobre a proteína GSK-3, os estudos dos efeitos do lítio sobre a expressão deste gene são quase inexistentes. Deste modo, uma análise dos efeitos do lítio sobre a expressão de genes específicos, relacionados com uma das mais importantes vias na patogênese da Doença de Alzheimer, deve permitir uma maior caracterização de alguns dos alvos funcionais desta droga.

1.1 Lítio inibe a transcrição de *GSK3b*: evidências *in vitro* e *in vivo*

Artigo aceito para publicação na revista *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*.

Autores: Camila Teixeira Mendes, Fábio Borges Mury, Eloísa de Sá Moreira, Fernando Lopes

Alberto, Orestes Vicente Forlenza, Emmanuel Dias-Neto & Wagner Farid Gattaz. **Lithium**

inhibits GSK3 β transcription: evidences from in vitro and in vivo studies. European

Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences. In Press 2008.

Lithium inhibits *Gsk3b* transcription: evidences from in vitro and in vivo studies.

Camila Teixeira Mendes^{1,2}, Fábio Borges Mury^{1,2}, Eloísa de Sá Moreira³,

Fernando Lopes Alberto³, Orestes Vicente Forlenza¹,

Emmanuel Dias-Neto^{1#*} & Wagner Farid Gattaz^{1#}

1- Laboratory of Neurosciences - LIM27, Department & Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil. 2- Institute of Biomedical Sciences – Department of Biotechnology, University of Sao Paulo, Brazil. 3 - Fleury Institute, Molecular Methods Sector, Sao Paulo, Brazil.

#Corresponding authors at Laboratório de Neurociências (LIM27), Instituto de Psiquiatria.

Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo. Phone (+5511) 3069 8010; Fax (+5511) 3069 7535. These authors contributed equally to this work.

Address: Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 785 - 05403-010 São Paulo - SP – Brazil

* Present address: MD Anderson Cancer Center, University of Texas.

1515 Holcombe Blvd, Unit 1374. Houston, TX 77030, USA.

ABSTRACT

Background: There is evidence of increased systemic expression of active GSK3B in Alzheimer's disease patients, which apparently is associated with the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles. Due to its central role in the pathogenesis of AD, GSK3B is currently a promising target of the pharmaceutical industry. Whilst trials with specific GSK inhibitors in AD are under way, major attention has been focused on the neuroprotective effects of lithium. Whereas the direct and indirect inhibitory effects of lithium over GSK3 activity have been documented by several groups, its effects over *Gsk3* transcription have not yet been addressed. **Methods:** We used quantitative PCR to evaluate the transcriptional regulation of *Gsk3a* and *Gsk3b* in lithium-treated primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons. **Results:** We found a significant and dose-dependent reduction in the expression of *Gsk3b*, which was specific to hippocampal cells. This same effect was further confirmed in vivo by measuring GSK3 expression in different brain regions and in peripheral leukocytes of adult rats treated with lithium. **Conclusion:** Our studies show that LiCl can modulate *Gsk3b* transcription in vitro and in vivo. This observation suggest new regulatory effects of lithium over *Gsk3b*, contributing to the better understanding of its mechanisms of action, offering a new and complementary explanation for *Gsk3b* modulation and reinforcing its potential for the inhibition of key pathological pathways in Alzheimer's disease.

KEY WORDS: Lithium, Gsk3a, Gsk3b, Alzheimer disease, transcription, hippocampus.

INTRODUCTION

Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) is a serine–threonine kinase that intermediates various intracellular signaling pathways. Although the two GSK3 isoforms (A and B) have subtle differences, including sub-cellular localization and certain specialized functions (1,2), they also share a number of similar properties. GSK3 has been shown to phosphorylate several brain proteins, including amyloid precursor protein (APP) (3), neurofilaments (4) and the microtubule-associated protein Tau (5). It has been suggested that a dysfunction of GSK3A and B could play a role in diseases that are characterized by the deposition of amyloid plaques and/or the aggregation of Tau in hyper-phosphorylated state, such as Alzheimer’s disease (AD), fronto-temporal dementia (FTD) and other tauopathies. In patients with AD, there is evidence of increased systemic expression of active GSK3B (6), and in animal and *in vitro* models of AD, GSK3B appears to be associated with biological mechanisms that lead to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles.

The over-expression of Gsk3b in transgenic mice is associated with many neuropathologic features linked to neurodegeneration (7) and cognitive impairment (8) probably derived from axonal transport defects, that lead to abnormal behavioral phenotypes (9). Interestingly, most of the structural and functional deficits associated with overactive Gsk3b can be rescued or attenuated by its inhibition (10).

In view of its central role in the pathogenesis of AD, GSK3B is currently one of the most promising targets in the development of pharmaceutical compounds with potential disease-modifying properties. Numerous intracellular signaling pathways converge on GSK3 and regulate its activity via inhibitory serine-phosphorylation (11). Whilst trials with specific GSK3 inhibitors in AD are under way, major attention has been focused on the neuroprotective effects of lithium, one of the most used and studied GSK3B inhibitors.

Lithium inhibits GSK3 activity in vitro at concentrations of 1.0 to 2.0mM, within the plasmatic therapeutic window required for clinical use, i.e., 0.6 to 1.2mEq/L (5,12). Lithium prevents the accumulation of amyloid- β in several cell culture models, an effect attributed to the inhibition of GSK3 (13). Phiel et al. (14) showed that a three-week treatment with lithium significantly decreased the levels of amyloid- β peptide in the brains of the AD model APP-Swedish/Tg2576 mice and suggested that GSK3A is involved in the amyloidogenic cleavage of the APP. Thus the inhibition of GSK3 reinforces the potential use of lithium in the treatment and, possibly, in the prevention of AD. In fact, we have recently provided the first clinical evidence that chronic LiCl treatment may reduce the risk for AD, in a sample of elderly patients with bipolar disorder (15).

The inhibitory effects of lithium on GSK3 activity have been documented by several groups (5,12,16-18). It is accepted that lithium inhibits GSK3 directly and indirectly. In the direct inhibition lithium competes with magnesium at the cationic binding site of GSK3, which is a requirement for enzymatic activation. Some authors suggest that the indirect inhibition of GSK3 by lithium could involve the activation of protein kinase B (AKT/PKB), usually in response to insulin or insulin growth factors, leading to the phosphorylation of single serine residues (serine-21 for GSK3A; serine-9 for GSK3B) of its regulatory aminoterminal domain (19,20).

To the best of our knowledge, the effects of lithium on the GSK3 transcription have not yet been addressed. To investigate this question we used quantitative PCR (qPCR) to evaluate the transcriptional levels of *Gsk3a* and *Gsk3b* in lithium-treated primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons. We found a significant, dose-dependent and localized reduction in the expression of *Gsk3b*, without significant alterations of mRNA levels of other genes of this same pathway. The findings of lithium effects over *Gsk3* were then confirmed in

vivo, after measuring the expression of these genes in LiCl-treated adult rats, which reinforced the veracity of this regulation.

METHODS

All procedures involving laboratory animals were approved by the local Animal Care Committee and conducted in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (ISBN 0-309-05377-3, NIH publication No. 86-23, revised 1985). All experiments were performed at the Laboratory of Neuroscience (LIM-27) at the Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo, Brazil.

Treatment of primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons with LiCl

Wistar rats were sacrificed at gestational day 18 (E18), and their embryos were collected by laparotomy. Whole embryonic brains were isolated and maintained immersed in Hank's balanced salt solution (HBSS - Gibco BRL, USA). Cortices and hippocampi were dissected, and fragments were dissociated by trypsinization, followed by mechanical dissociation in Hank's solution containing inactivated horse serum (10%), Hepes buffer (10mM), DNase (10µg/ml) and MgCl₂ (8mM). Cells were counted and re-suspended in neurobasal medium containing B-27 supplement (Gibco BRL), glutamine (2mM), penicillin (100I.U.), streptomycin (100µg/ml), and 5% fetal calf serum (Gibco BRL) and plated onto poly-D-lysine coated dishes (1x10⁷ cells/plate). Culture medium was replaced by serum-free medium after 24 hours of incubation and half-changed every 48 hours. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂. Neuronal viability was microscopically ascertained prior to experimentation. After 5 days in culture (DIC), cultures were incubated for another 5 days with different concentrations of LiCl (Merck, Germany) ranging from 0.02mM to 2mM. All

results presented here were derived from three independent primary neuronal cultures, and all real-time qPCR were performed in triplicates.

Treatment of adult rats

The effects of LiCl treatment on the expression of Gsk3 were also investigated in vivo. Twelve male Wistar rats, 2.5 to 3 months old were obtained from the Central Animal Laboratory House (UNIFESP, Brazil), housed in polypropylene cages maintained at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 12-hour light/dark cycles, and provided with a standard diet and free access to water. After two weeks of acclimatization, animals were divided in three groups of four animals, and each group was treated twice a day with 1mL intra-peritoneal injections of 0.9% NaCl (saline control) or LiCl dissolved in saline, in the final concentrations of 5mg (0.12mMol) or 10mg (0.24mMol) of LiCl/Kg of body weight. No anesthetics were used for the injections and all animals were treated for 35 consecutive days. During this period, blood samples were collected once a week (tail cuff method), 12 hours after the last administration and immediately before the next one, and used for determining serum lithium levels. After 35 days, blood was collected, animals were sacrificed by decapitation, following the immediate removal of the frontal cortex and both hippocampi, which were then stored at -80°C for further mRNA analysis.

mRNA extraction and cDNA synthesis

For each treatment group, three distinct primary neuronal cultures or samples of four rat brains were homogenized in TRIzol® Reagent (Gibco BRL) and RNA was prepared according to Chomczynski and Sacchi (22). For RNA extraction of leukocytes, white blood cells were disrupted in RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA), homogenized with a QIAshredder and RNA was purified using the QIAamp® RNA Blood Kit (Qiagen). cDNA

synthesis was performed in a 20 μ l reactions containing 2 μ g of total RNA, 110pmol of oligo dT₁₂₋₁₈, 3mM MgCl₂, 0.5mM of each dNTP and 200 units of ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI-USA).

Gene expression analyses by quantitative PCR

Oligonucleotide primers were designed using the software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). To reduce genomic DNA amplifications, primers were designed to anneal to different exons of the studied genes. Repetitive regions were masked (<http://www.repeatmasker.org>) and duplicates of 10ng total RNA equivalents of cDNA were used in each amplification, together with 0.25pmol of each primer. qPCR was performed in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System using SYBR Green I (Applied Biosystems, USA) in a final volume of 15 μ l. The thermal amplification profile consisted of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Each assay included a no-template control as well as three endogenous control genes for normalization (Actb, Npy and Hprt1 - selected by geNorm) (23). The sequences of the oligonucleotide primers used in this study are presented in Table I. Fluorescence was continually monitored during the melting process and no nonspecific amplification products or primer-dimer artifacts were detected.

Data analyses were performed using the Sequence Detection Software, version 1.3.1 (Applied Biosystems). Relative gene expression levels were normalized to the geometric mean of the endogenous controls (23).

Statistical analysis

The experimental results are expressed as means $\pm$ S.E.M. with the number of experiments indicated. One-way ANOVA followed by correction using post hoc Tukey was

used to determine significant differences in the in vitro and in vivo studies. $P \leq 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Effects of LiCl on GSK expression in cultured neurons

Baseline mRNA levels indicative of *Gsk3* expression were significantly different according to the brain areas from which cultures were started. Primary cortical neurons displayed a 1.6-fold higher expression of *Gsk3a* and a 2.3-fold higher expression of *Gsk3b* as compared to primary hippocampal neurons. The results of three independent cultures of cortical and hippocampal neurons showed that the treatment with LiCl for 5 days resulted in a statistically significant inhibition of *Gsk3b* transcription in cultured hippocampal, but no inhibition was found in cortical neurons. The findings not only suggest a region-specific effect of lithium, but the results clearly demonstrate a dose-dependent effect, which reinforces the veracity of these findings. While no alterations could be seen in cortical cells, hippocampal neurons treated with LiCl showed significant reductions of mRNA levels of *Gsk3b*. LiCl concentrations of 2mM, 0.2mM and even 0.02mM resulted in significant reductions of *Gsk3b* transcription, respectively reducing the mRNA levels in $50 \pm 7\%$ ($p=0.001$), $40 \pm 4\%$ ($p=0.004$) and $32 \pm 20\%$ ($p=0.024$). No significant alterations in *Gsk3b* mRNA could be seen when 0.002mM of LiCl was used (data not shown). For *Gsk3a*, the only alteration observed was when the higher dose of LiCl (2mM) was used to treat hippocampal neurons in culture. In this situation, a significant reduction ($34 \pm 5\%$, $p=0.03$) was observed for this gene. Overall, the experiments in culture showed a consistent effect of LiCl leading to a reduction of *Gsk3b* expression (Figure 1).

In vitro effects of LiCl on the expression of genes encoding Gsk3-related proteins

We also evaluated the effects of LiCl treatment over the expression of another 8 genes of the Gsk3 pathway, in order to evaluate if the results observed could be due to a broad depression of the neuronal transcriptional machinery. The genes evaluated for this purpose were *Bace1*, *App*, *Psenen*, *Mapt*, *Ctnnb1*, *Wnt7a*, *Akt1*, *Inpp1*. As can be seen in Figure 2, no statistically significant alterations could be seen in the expression of any of these genes, suggesting the specific effects of LiCl over the expression of Gsk3b.

In vivo effects of LiCl on Gsk3 transcription

The intracerebral modulation of *Gsk3b* expression by lithium was also observed in vivo. Adult rats treated with 5mg/kg/day or 10mg/kg/day of LiCl attained mean lithium serum levels of 0.1 ± 0.04 mEq/L and 0.6 ± 0.2 mEq/L (respectively). No significant effects on body weight were observed as a consequence of LiCl treatment (data not shown). To evaluate a possible tissue-specificity of LiCl regulation, *Gsk3* levels were investigated in two brain areas and in leukocytes of these animals. No significant differences were observed in the mean mRNA levels of *Gsk3a* in the frontal cortex, hippocampus or leukocytes for both treatment groups as compared to controls (Figure 2). However, we found a significant inhibition of *Gsk3b* transcription in the hippocampus, but not in the cortex nor in the peripheral leukocytes of LiCl treated rats. The mean percent reduction of hippocampal *Gsk3b* expression was $39 \pm 6\%$ ($p=0.001$) and $63 \pm 6\%$ ($p<0.001$), respectively in rats treated with 5mg/kg/day ($N=4$) or 10mg/kg/day ($N=4$) of LiCl (Figure 3). LiCl-treatment resulted, once again, in a specific, dose-dependent and hippocampal-restricted reduction of *Gsk3b*.

DISCUSSION

Lithium has been widely used for over five decades in the treatment of major psychiatric disorders (24). The exact mechanisms that underlie its effects as a mood-stabilizing agent are still poorly understood, but probably include its capability of inhibiting GSK3B (5,12). The neurobiological effects of lithium on GSK3 have so far been attributed to the direct and indirect inhibition of enzymatic activity. In the current study, we provide experimental evidences that lithium may also affect the transcriptional regulation of *Gsk3b*.

Given the central role of GSK3B in the pathogenesis of AD, bipolar disorder and other conditions, the identification of its specific modulators will be of great importance. However, due to the structural and regulatory similarities between GSK3A and GSK3B, the development of drugs that can specifically inhibit one of these two isoforms may be a difficult task. At the aminoacid level, the kinase domains of GSK3A and GSK3B are almost identical and these proteins have apparently the same functions in the Wnt pathway. However, the sequence diversity observed at the amino- and carboxyl-terminus may be responsible for the distinct biological properties of each isoform. In the search for specific inhibitors, a way to overcome the close protein similarity between these proteins would be to identify agents that target *GSK3B* at its nucleotide level, by either blocking its transcription or inhibiting its translation. Experiments based on this rationale have been proposed by Musmann et al. (25).

Our results, both in cultured neurons and in vivo, indicate that therapeutic (or even lower) LiCl concentrations, leads to a remarkable hippocampal specific, dose-dependent, transcriptional inhibition of GSK3B expression (above 50%, $p < 0.001$).

Gould et al. (26), using cytosolic β -catenin as an indirect marker of in vivo GSK3 activity, reported a reduction of *Ctnnb1* (β -catenin) mRNA levels in rats treated with lithium

in concentrations equivalent to therapeutic levels in humans. However, because in our experiments the effect of lithium on the expression of *Gsk3b* occurred at lower concentrations than those required to inhibit the transcription of *Gsk3a*, we speculate that the modulation of *Gsk3* isoform's expression may be even more complex. In an analysis of the papers of Lau et al. (27) and Lee et al. (28), it is noteworthy that the promoters of *Gsk3a* and *Gsk3b* have a remarkably different structure, in terms of regulatory elements and transcription initiator factors. This distinct promoter structure organization reinforces the diversity of the transcriptional regulation of these genes and may explain the differential responses to LiCl observed here.

In AD, overactive GSK3B favors the hyper-phosphorylation of Tau and the amyloidogenic cleavage of APP, which are critical events in the formation of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. In mice (14) and in *Drosophila* models (9), lithium reversed the pathological effects of GSK3 over-expression. Accordingly, in elderly patients, the chronic exposure to lithium used to treat bipolar disorder, was associated with a smaller prevalence of dementia and AD, as compared to age-matched bipolar patients treated with other mood-stabilizing drugs (15). Our findings suggest a new complementary mechanism for LiCl as a GSK3B inhibitor. The observation of a significant reduction in the *Gsk3b* transcription, even at very low concentrations, together with the data of Nunes et al. (15) may suggest the possible use of this agent in the treatment or even in the prevention of Alzheimer's disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research presented here was supported by ABADHS (Associação Beneficente Alzira Denise Herzog da Silva), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico) and FAPESP (Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). The authors recognize the valuable technical support of Sergio Catanozi, Jussara Cordeiro Rocha and Vanessa de Jesus de Paula, and the kind help of Prof. Suely Kazue Nagahashi Marie with the organization of space for our studies in her animal house.

FINANCIAL DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1- Hoshi M, Sato M, Kondo S, Takashima A, Noguchi K, Takahashi M, et al (1995): Different localization of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta from glycogen synthase kinase-3 alpha in cerebellum mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* 118:683-5.
- 2- Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, et al (1994): Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem* 63:245-55.
- 3- Aplin AE, Gibb GM, Jacobsen JS, Gallo JM, Anderton BH (1996): In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 67:699-707.
- 4- Guan RJ, Khatra BS, Cohlberg JA (1991): Phosphorylation of bovine neurofilament proteins by protein kinase FA (glycogen synthase kinase 3). *J Biol Chem* 266:8262-8267.
- 5- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1997): Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 7:196.

- 6- Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, et al (2005): Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 373:1-4
- 7- De Strooper B, Woodgett J (2003): Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature* 423: 392-393.
- 8- Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ (2002): Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529-33.
- 9- Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, et al (2004): GSK-3 beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioral phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 9: 522-530.
- 10- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, et al (2007): Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25: 81-86.
- 11- Stambolic V, Woodgett JR (1994): Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303: 701-704.
- 12- Klein PS, Melton DA (1996): A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8455-8459.
- 13- Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, et al (2002): Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100, *Neurosci. Lett* 321: 61-64.
- 14- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003): GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423: 435-439.

- 15- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF (2007): Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 190: 359-360.
- 16- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (2004): Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313-1317.
- 17- De Sarno P, Li X, Jope RS (2002): Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43:1158-1164.
- 18- Jope RS (2003): Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci.* 24:441-443.
- 19- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (1999): Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8745–8750.
- 20- Frame S, Cohen P (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:01-16.
- 21- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PSJ (2003): Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *Biol. Chem* 278: 33067–33077.
- 22- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- 23- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.

- 24- Cade JF (1949): Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. Medical Journal of Australia 2:349–352.
- 25- Mussmann R, Geese M, Harder F, Kegel S, Andag U, Lomow A, Burk U, et al (2007): Inhibition of glycogen synthase kinase (GSK) 3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells. J Biol Chem 282:12030-12037
- 26- Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK (2004): Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. Mol Psychiatry 9:734-55.
- 27- Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC (1999): Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3beta promoter. Genomics 60:121-128.
- 28- Lee KF, Chan JY, Lau KF, Lee WC, Miller CC, Anderton BH, et al (2000): Molecular cloning and expression analysis of human glycogen synthase kinase-3 alpha promoter. Brain Res Mol Brain Res 84:150-157.

Figure Legends

Figure 1. Effects of LiCl treatment on *Gsk3a* and *Gsk3b* mRNA levels in primary cultures of hippocampal and cortical neurons, as compared to untreated controls. Three distinct primary cultures of neurons were incubated for five days, in triplicates, with different concentrations of LiCl, ranging from 20nM to 2mM. Total RNA was extracted and expression levels of *Gsk3a* and *Gsk3b* were measured in triplicates by qPCR. Data are presented as the means $\pm$ S.E.M. and bars represent the percent changes in mRNA expression for each experimental condition, after normalizing by the average expression of three endogenous controls, as compared to controls (100%). ANOVA analysis showed that no significant alterations could be observed for any of the genes in cortical neurons (A, B) or in hippocampal *Gsk3a* (C). However, LiCl treatment resulted in a significant decrease in *Gsk3b* mRNA levels hippocampal cultures compared to controls (D). * $p=0.001$ for LiCl 2mM; $p=0.004$ for LiCl 0.2mM and $p=0.024$ for LiCl 0.02mM.

Figure 2. Effects of LiCl treatment of primary cultures of hippocampal neurons, over the expression of genes related to Gsk3 pathways. Three distinct primary cultures of neurons were incubated for five days, in triplicates, with 0.2 or 2.0 mM of LiCl. Total RNA was extracted and expression levels of *Bace1*, *App*, *Psenen*, *Mapt*, *Ctnnb1*, *Wnt7a*, *Akt1*, *Inpp1* were determined in triplicates by qPCR. Data are presented as the means $\pm$ S.E.M. and bars represent the percent changes in the normalized mRNA expression for each experimental condition as compared to controls (100%). Statistical analysis showed that no significant alterations could be observed for any of these genes ($p>0.05$).

Figure 3. In vivo effects of LiCl treatment over mRNA expression of *Gsk3a* and *Gsk3b* in leukocytes, brain cortex and hippocampus of rats. Twelve adult rats were treated for 35 consecutive days with two daily intra-peritoneal injections of saline (N=4), or LiCl at two distinct doses (5mg/kg/day (N=4) or 10mg/kg/day (N=4)). Total RNA was extracted from leukocytes or from homogenates of cortical and hippocampal tissues. *Gsk3a* and *Gsk3b* levels were quantified by qPCR as described. Data are presented as relative means $\pm$ S.E.M. and bars represent the percent changes in mRNA expression for each experimental condition as compared to controls (100%). ANOVA analysis showed no significant alterations for any of the investigated genes in leukocytes (A and B) or in the brain cortex (C and D) ($p>0.05$). This same analysis showed that lithium treatment caused no alterations in the transcription levels of hippocampal *Gsk3a* (panel E), but resulted in a significant reduction of *Gsk3b* in hippocampus for both drug concentrations ($p=0.001$), (panel F).

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

1.2 Resultados suplementares

1.2.1 Análise de expressão protéica de GSK-3a e GSK-3b – Western Blot

Sabe-se que a expressão gênica não é linear à produção de proteínas. Além disto, é de se esperar que alterações de mRNA com significado biológico, levem a alterações na quantidade de proteína produzida. Assim, a análise por Western Blot da proteína codificada pelo gene de *Gsk3b* cuja expressão foi encontrada reduzida em hipocampo poderia elucidar se os efeitos transcripcionais observados seriam traduzidos em alterações na quantidade de proteína produzida. A redução da quantidade de GSK3b total, após o tratamento com lítio apontaria para uma maior probabilidade de que a redução da quantidade de mRNA tivesse consequências funcionais.

1.2.1.1 Metodologia

Culturas de neurônios corticais e hipocampais foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e lisadas pela adição de 1ml de tampão RIPA (Assay Designs), contendo inibidores de protease (2µg/mL aprotinina, 2µg/mL leupeptina, 200µM sódio ortovanadato, e 1mM PMSF), por 15 minutos. Em seguida as células foram raspadas e os homogenatos de neurônios foram centrifugados a 14.000xg por 10 minutos.

As amostras contendo 20µg de proteína foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, separadas por eletroforese a 120V (Mini-protean 3, Bio Rad), e eletrotransferidas a membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences). Os blots foram bloqueados com 5% de leite desnatado em TBS-T (10mM Tris-base, 100mM NaCl, 0.2% Tween 20) e depois incubados com anticorpos primários, que consistiam de anticorpo monoclonal contra GSK-3b total (anti-tGSK) (Sigma), ou anticorpo policlonal anti-pGSK (Cell Signaling) contra resíduos fosforilados de GSK-3a e GSK-3b (serina 21 e serina 9 respectivamente). O anticorpo contra GSK-3b total foi diluído 1:2.000 em TBS e incubado por uma hora a temperatura ambiente, anti-pGSK foi diluído 1:1.1500 em TBS e incubado overnight a 4°C. As membranas foram lavadas com TBS-T e depois incubadas com anticorpos secundários biotinilados (anti-mouse IgG para anti-tGSK, ou anti-rabbit IgG para anti-pGSK, ambos diluídos 1:400 em TBST). Finalmente as membranas foram incubadas com a horseradish peroxidase-linked complex. As bandas imunoreativas foram detectadas por quimioluminescência (ECL, GE Healthcare), e análises de densitometria foram feitas usando Chemiimager™ 4.000 - AlphaEase™ Software - Version 5.5 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

1.2.1.2 Resultados e Discussão

Duas bandas imunoreativas foram confirmadas em cultura de neurônios corticais e hipocampus referentes à GSK-3a (51kDa) e GSK-3b (46kDa). Utilizando anticorpo reativo às formas fosforiladas de ambas isoformas observamos um aumento de fosfo-GSK-3a e fosfo-GSK-3b ao longo do tratamento com lítio nas culturas de diferentes regiões cerebrais. Esse aumento da imunoreatividade foi observado por análise densitométrica das bandas e verificamos um aumento da fosforilação das duas isoformas de GSK3 induzido por lítio tanto em córtex quanto hipocampo (Figura 6).

Figura 6 - Análise descritiva da imunoreatividade de fosfo-GSK-3a e fosfo-GSK-3b ao longo do tratamento com lítio nas culturas de córtex (A e B) e hipocampo (C e D). Os valores de densitometria estão em porcentagem em relação à cultura controle, ou seja, sem tratamento, que foi fixada em 100%.

A forma ativa de GSK3b é fosforilada no resíduo tirosina-216 enquanto que a forma inativada é fosforilada no resíduo serina-9 (Murai et al., 1996). A análise descritiva de um único

experimento nos mostra que a imunoreatividade de GSK3 na sua forma inativada tende a aumentar ao longo do tratamento com lítio, aparentemente de modo dose dependente, tanto em córtex como hipocampo e nas duas isoformas de GSK3. Como GSK3 é inativada por fosforilação, esses achados reforçam a idéia de que lítio contribui para sua inativação, como descrito por Gomez-Ramos et al., revisado em 2006.

Usando um anticorpo que não discrimina a forma ativa da inativa tentamos assim quantificar os níveis totais da enzima. Como pode ser visto na figura 7 não encontramos redução do nível protéico de GSK3b em hipocampo e encontramos um aumento em córtex. Deste modo, nossos achados de redução de mRNA não foram corroborados pelas análises de expressão protéica de GSK3b. Os resultados apresentados a seguir mostram que a redução dos níveis de mRNA de GSK3b em hipocampo não resulta em uma diminuição na quantidade de enzima GSK3b produzida nesse tecido no momento da observação e análise (Figura 7).

Figura 7 - Análise quantitativa da imunoreatividade de GSK3a e GSK3b total ao longo do tratamento com lítio nas culturas de córtex (A) e hipocampo (B). Os valores de densitometria estão em porcentagem em relação à cultura controle, ou seja, sem tratamento, que foi fixada em 100%.

Porém sabe-se que alterações nos níveis de mRNA não necessariamente resultam em alterações dos níveis protéicos e que os efeitos terapêuticos do lítio poderiam ocorrer por meio de mecanismos pós-transcricionais e/ou pós-traducionais. Sendo assim, mostramos que os efeitos de lítio ocorrem na redução dos níveis de mRNA de GSK-3b e continua obscura a relação entre lítio e expressão gênica. Ainda não se pode afirmar que lítio induz a redução na produção de mRNA de GSK-3b ou uma degradação mais acelerada de mRNA.

A falta de correspondência entre os níveis de RNA e proteína necessita maiores explorações, uma vez que a inibição da transcrição de GSK3 não esta acompanhada por um decréscimo da expressão da proteína nas mesmas condições de análise. Isso pode ser devido às limitações metodológicas da quantificação da imunoreatividade que certamente não é sensível como a quantificação de RNA. E outra possível explicação seria que a proteína GSK3b seja bastante estável e uma redução nos níveis de mRNA leve algum tempo, maior do que o intervalo analisado, para refletir em uma redução na quantidade de proteína. Esses resultados serão analisados novamente usando tempos de incubação diferentes com lítio (*time-points*) nas culturas de neurônios. Esse tipo de ensaio é importante para demonstrar em quanto tempo de tratamento com lítio seria necessário para reduzir os níveis de mRNA de GSK3 e tentar correlacionar com o tempo que essa redução também resultaria na redução dos níveis protéicos.

A redução de mRNA de GSK3b levando a uma redução dos níveis protéicos e atividade pode afetar cascatas de sinalização como as de WNT e PI-3 quinase influenciadas por GSK3b. Dentro da cascata de WNT a redução de GSK3b pode levar a um acúmulo de β -catenina no citosol levando a sua translocação para o núcleo resultando na liberação de inibidores e superexpressão de genes alvo de WNT (Doble e Woodgett, 2003).

1.2.2 Análise de expressão gênica em pacientes bipolares

A fim de investigar se os efeitos do tratamento com lítio observados nas culturas de células de ratos, e nos animais tratados *in vivo* (Mendes et al., 2008) poderiam também ser vistos em pacientes cronicamente tratados com lítio, nós investigamos a expressão de GSK3 em leucócitos de pacientes com TAB que faziam ou não uso de lítio. Como sabemos da importância dos genótipos de *ApoE* no desenvolvimento da DA, o status deste gene também foi avaliado nestas amostras.

Sessenta e um pacientes idosos com TAB foram convocados ao Laboratório de Neurociências (LIM27) no Instituto de Psiquiatria, Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão foram: (1) diagnóstico de TAB, de acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV, 1994); (2) Idade igual ou superior a 60 anos; (3) Tratamento contínuo de TAB por pelo menos seis meses antes; (4) Eutímia há no mínimo um mês segundo relato do paciente e pontuação inferior a sete pontos no item 21 da escala *Hamilton Rating Scale for Depression* (HAM-D, Hamilton 1960), e inferior a quatro na escala *Young Mania Rating Scale* (YMRS, Young et al., 1978). Pacientes tratados com eletro-convulsoterapia (ECT) nos últimos seis meses, portadores de

doenças clínicas com impacto sobre a capacidade cognitiva, bem como dependências por álcool ou drogas ou comorbidades por outras doenças psiquiátricas foram excluídos do estudo.

Indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o uso de lítio. O grupo usuário de lítio com 31 pacientes que tomavam lítio por pelo menos seis meses, e em média faziam uso de lítio por seis anos (dose diária média de carbonato de lítio: 600 ± 120 mg e média das litemias: $0,55 \pm 0,26$ mEq/L) O grupo não-usuário com 26 pacientes tratados com outros estabilizadores de humor por pelo menos seis meses. A análise demográfica e detalhes clínicos dessa amostra estão descritos em Nunes e colaboradores (2007). O trabalho com estes pacientes foi feito em colaboração com a Dra Paula Nunes, psiquiatra do ambulatório de Alzheimer que faz parte de nosso laboratório, no Instituto de Psiquiatria.

1.2.2.1 Metodologia

O RNA de leucócitos foi extraído por meio do kit QIAamp[®] RNA Blood (Qiagen Inc – Valencia, CA-USA). De acordo com esse kit, a partir de 1,5ml de sangue total, fazemos primeiramente a lise seletiva dos eritrócitos com a adição de 7,5ml de tampão EL (*Erythrocytes Lysis*) seguido de incubação no gelo por 10-15 minutos fazendo duas agitações rápidas durante esse período. Após a incubação essa solução foi centrifugada a 400g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi completamente removido e descartado. Os leucócitos intactos formaram um pellet e o restante de eritrócitos foi removido em seguida com a adição de 3ml de tampão EL ressuspensão das células por rápida agitação e novamente centrifugado a 400g por 10 minutos a 4°C com a completa remoção e descarte do sobrenadante.

Em seguida, fizemos a lise dos leucócitos pela adição de 600µl de tampão RLT com 10% de β-mercapto-etanol, seguida de homogeneização para evitar a formação de grumos de células. O lisado foi transferido para a coluna QIAshredder acoplada a um tubo coletor de 2ml, e centrifugado por dois minutos na velocidade máxima. A coluna foi descartada e ao homogenato lisado, retido no tubo coletor foi misturado a 600µl de etanol 70%. Essa solução foi transferida para a coluna QIAamp acoplada a um tubo coletor de 2ml e centrifugada por 15 segundos a 10.000rpm. O RNA total fica retido na membrana dessa coluna e em seguida submetido a uma lavagem com 700µl de tampão RW1 centrifugado por 15 segundos a 10.00rpm. A coluna foi acoplada a um novo tubo coletor e adicionado 500µl de tampão RPE com etanol, centrifugado por 15 segundos a 10.00rpm. A solução retida no tubo coletor foi descartada e a coluna foi

novamente eluída com 500µl de tampão RPE, centrifugada na velocidade máxima por três minutos. A coluna foi transferida para um tubo coletor de 1,5ml e foi adicionado 30µl de água RNase-free diretamente na membrana da coluna e centrifugado por um minuto a 10.000rpm. Esse procedimento foi repetido, resultando em um volume total de 60µl de RNA total.

A síntese de cDNA e a análise da expressão gênica de GSK-3a e GSK-3b foi feita de acordo com o protocolo descrito em Mendes e colaboradores (2008).

1.2.2.2 Resultados e Discussão

A expressão de GSK-3b foi significativamente reduzida em $23\% \pm 8\%$ ($p=0.0493$) no grupo usuário de lítio comparado ao grupo não usuário (Figura 8).

Figura 8 – Efeito do tratamento de lítio na expressão de *GSK3a* (A) e *GSK3b* (B) em leucócitos de pacientes com Transtorno Bipolar. O RNA total foi extraído de leucócitos e os níveis de GSK-3 foram quantificados por qPCR. As barras representam medianas dos níveis de expressão de mRNA de *GSK3a* e *GSK3b* no grupo usuário em relação ao grupo não usuário de lítio. Análise do teste *t Student* revelou que o uso de lítio resulta em uma diminuição significativa na expressão de GSK3b em pacientes usuários de lítio em relação aos que não faziam uso da droga (* $p=0,0493$).

Sabendo que a inibição da GSK3 tem sido aventada como um possível alvo terapêutico de outros medicamentos utilizados na clínica psiquiátrica, além do lítio, tais como haloperidol, a clozapina (Kozlovsky et al., 2005), a imipramina e o valproato (Roh et al., 2005) decidimos avaliar os pacientes em relação ao uso de lítio e valproato (Figura 9).

Figura 9 – Efeito do tratamento com lítio e ácido valpróico na expressão de GSK-3a (A) e GSK-3b (B) em leucócitos de pacientes com Transtorno Bipolar. O RNA total foi extraído de leucócitos e os níveis de GSK-3 foram quantificados por qPCR. As barras representam medianas dos níveis de expressão de mRNA de GSK-3a e GSK-3b nos grupos: usuários de lítio, lítio+ácido valpróico e ácido valpróico em relação ao grupo não usuário de nenhuma das duas drogas.

Como visto na figura 9, quando analisamos separadamente cada um dos grupos de pacientes, estratificando-os conforme a droga utilizada, observamos que os níveis de *GSK3b* nos pacientes usuários de lítio (n=26) ainda apresenta uma redução de 42,8% em relação aos 17 pacientes do grupo controle (não-usuários de valproato ou de lítio). Além disto, vemos que os níveis de mRNA de *GSK3b* nos pacientes tratados com uma associação de lítio + valproato, é inferior quando comparado aos pacientes tratados apenas com valproato. Estes dois achados sugerem que o uso crônico de lítio leva a uma redução mais ampla da expressão de *GSK3b*, tornando-a detectável mesmo em células estranhas ao SNC. No entanto, diante do pequeno N amostral obtido após esta estratificação, os níveis de redução perdem seu significado estatístico.

Os efeitos do ácido valpróico são controversos no que diz respeito à neuroproteção e inibição da GSK3. O ácido valpróico aumenta a expressão de genes relacionados à via de ERK, relacionada com crescimento de neuritos, sobrevivência celular, aumento de captação e liberação de noroepinefrina (Yuan et al., 2001). Alguns estudos apontam ações inibitórias sobre GSK3 (Chen et al., 1999) mas não têm a mesma consistência e intensidade das apresentadas com lítio (Gould et al., 2004; Su et al., 2004). Outro estudo comparando lítio e valproato em cultura de neurônios cerebelares demonstrou não apenas que valproato não tinha ações sobre GSK3 como não impediu a fosforilação da tau, mediada pela GSK3, nem a morte neuronal, chegando até a exacerbá-la em algumas condições (Jin et al., 2005).

1.2.3 Genotipagem ApoE

Sabemos que existe um importante efeito do status polimórfico do gene codificador da ApoE sobre a predisposição ao desenvolvimento da DA. Deste modo, pacientes portadores de alelos *Apoε4*, têm de três a quatro vezes mais chances de desenvolver a doença quando comparados como o risco na população geral (Corder et al., 1993). O risco de desenvolvimento da DA em um indivíduo que carrega os dois alelos $\epsilon 4$ poderá ser de oito até 14 vezes maior (Saunders et al., 1993) que o risco da população em geral. Por outro lado, o alelo $\epsilon 2$ aparentemente confere a seus portadores um efeito protetor (Farrer et al., 1997). Sendo assim, decidimos avaliar os pacientes estudados, de modo a verificar se a pior evolução cognitiva se deu realmente pelo não-uso do lítio ou por uma maior quantidade de pessoas com alelos $\epsilon 4$ entre os que não tomaram lítio.

1.2.3.1 Metodologia

Oligos foram desenhados flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR e duas sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporter* e os *quencher* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmara CCD localizada no aparelho ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda, e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR.

Os oligos e sondas utilizadas foram adquiridos junto à empresa Applied Biosystems. Dois ensaios foram utilizados:

(1) C_3084793_20 (Assay ID) que se refere ao SNP rs429358 (NCBI SNP Reference), mutação *mis-sense*, cuja sequência é: 5'-CGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGCCTGGTGCAGTA- 3', marcados com VIC (Reporter 1 Dye) e FAM (Reporter 2 Dye).

(2) C_904973_10 (Assay ID) que se refere ao SNP rs7412 (NCBI SNP Reference), mutação *mis-sense*, cuja sequência é: 5'-TGCCGATGACCTGCAGAAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCG - 3', marcados com VIC (Reporter 1 Dye) e FAM (Reporter 2 Dye).

O Master Mix das reações foi feito com 0,25µl de Kit-assay 20X, 2,5µl de TaqMan 2X PCR Mix e 5ng de DNA para um volume final de reação de 5µl. Os possíveis genótipos esperados estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Genótipos esperados

	Genótipo	rs429358	rs7412
Homozigotos	E2/E2	T/T	T/T
	E3/E3	T/T	C/C
	E4/E4	C/C	C/C
Heterozigotos	E2/E3	T/T	T/C
	E2/E4	T/C	T/C
	E3/E4	T/C	C/C

1.2.3.2 Resultados e Discussão

Nas tabelas 2 e 3 apresentamos os dados de genotipagem para ApoE nesses pacientes bipolares idosos.

Tabela 2 – Genotipagem de ApoE em pacientes bipolares idosos.

Amostra	ApoE1	ApoE2	Genótipo	Cognição	Uso de Lítio
1666	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1667	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1668	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Não
1669	T/C	C/C	E3/E4	TCL	Não
1670	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Sim
1671	T/C	C/C	E3/E4	Dem.	Não
1672	T/C	C/C	E3/E4	TCL	Sim
1673	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Sim
1746	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Sim
1747	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Não
1748	T/C	C/C	E3/E4	DA	Não
1749	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Não

Continua

Tabela 2 (Continuação)

Amostra	ApoE1	ApoE2	Genótipo	Cognição	Uso de Lítio
1750	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1751	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Sim
1752	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Sim
1753	T/T	C/C	E3/E3	DA	Sim
1754	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1755	T/T	C/C	E3/E3	DA	Sim
1756	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1757	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Não
1758	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Sim
1759	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Não
1770	T/C	C/C	E3/E4	DA	Não
1771	T/T	C/C	E3/E3	DA	Sim
1772	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1785	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Não
1786	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Sim
1788	T/T	Indeterminado		Norm.	Não
1793	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Sim
1794	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Não
1795	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1797	T/T	T/C	E2/E3	DA	Não
1798	T/C	C/C	E3/E4	DA	Não
1799	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Sim
1800	T/C	T/C	E2/E4	DA	Não
1801	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1802	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Não
1803	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Sim
1810	T/C	C/C	E3/E4	TCL	Não
1811	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Sim
1812	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Não
1815	T/T	C/C	E3/E3	Dem.	Sim
1816	T/C	C/C	E3/E4	Norm.	Não
1817	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1818	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1824	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1825	T/T	C/C	E3/E3	TCL	Não
1826	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1827	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1828	T/C	C/C	E3/E3	Dem.	Não
1830	T/T	T/C	E2/E3	DA	Não
1831	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim
1835	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Não
1836	Indeterminado	C/C		Norm.	Sim
1837	T/C	C/C	E3/E4	DA	Não
1839	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Sim
1840	T/C	T/C	E2/E4	DA	Sim
1841	T/T	C/C	E3/E3	Norm.	Sim

Continua

Tabela 2 (Continuação)

Amostra	ApoE1	ApoE2	Genótipo	Cognição	Uso de Lítio
1843	T/T	T/C	E2/E3	Norm.	Não
1842	T/C	C/C	E3/E4	TCL	Sim

NOTA: Abreviações: Norm.= paciente normal em relação à avaliação cognitiva; TCL = paciente com transtorno cognitivo leve; Dem.= paciente com demência que não seja Alzheimer; DA= paciente com doença de Alzheimer.

Tabela 3 - Genotipagem de *ApoE* em pacientes bipolares idosos em relação ao seu status cognitivo e o uso de lítio.

	Cognição	Genótipo	Quantidade	Porcentagem (%)
Lítio	Normal	E3/E3	5	45,46
		E2/E3	3	27,28
		E3/E4	2	18,2
		Indeterminado	1	9,1
	TCL	E3/E3	3	75
		E3/E4	1	25
	DA	E3/E3	5	100
	Demência (não DA)		0	
Não Lítio	Normal	E3/E3	3	50
		E2/E3	2	33,34
		Indeterminado	1	16,66
	TCL	E3/E3	3	75
		E3/E4	1	25
	DA	E3/E4	3	50
		E2/E3	1	16,66
		E2/E4	1	16,66
		E3/E3	1	16,66
	Demência (não DA)	E3/E4	1	100

As frequências alélicas e genotípicas de *ApoE* foram determinadas nesses pacientes com o intuito de verificarmos se a frequência maior do alelo $\epsilon 4$ na população dos pacientes não usuários de lítio, ou uma maior frequência de $\epsilon 2$ na população tratada com lítio, não estaria influenciando o desempenho cognitivo encontrado (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência Alélica e Genotípica de *ApoE* em pacientes bipolares idosos em relação ao uso de lítio.

Genótipos	Lítio (n=33 pacientes)	Não Lítio (n=25 pacientes)	
2;3	4 (12%)	5 (20%)	
2;4	1 (3%)	1 (4%)	X ² 4.18
3;3	22 (67%)	10 (40%)	p 0.24
3;4	6 (18%)	9 (36%)	
Alelos	Lítio	Não Lítio	
2	5 (8%)	6 (12%)	
3	54 (80%)	34 (68%)	X ² 3.02
4	7 (12%)	10 (20%)	p 0.22

Como pode ser visto acima não encontramos diferenças significativas na frequência alélica e genotípica de *ApoE* nessas duas populações de pacientes bipolares. Portanto, podemos descartar que o status de *ApoE* tenha sido o responsável pela maior incidência de DA no grupo não usuário de lítio. Deste modo, estas análises reforçam o conceito de que o uso prolongado do lítio poderia resultar em um melhor status cognitivo. De acordo com nossos achados, este efeito de lítio poderia ser devido às ações desta molécula na redução dos níveis de GSK3B.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL E NO PROTEOMA, INDUZIDAS PELO LÍTIO

Após observarmos que lítio parecia regular a expressão de *Gsk3b*, partimos para uma análise mais ampla, que permitisse avaliar outros efeitos do lítio, talvez com o potencial de apontar genes ou proteínas responsáveis pela regulação observada. Deste modo, partimos para uma análise dos efeitos de lítio sobre o transcriptoma (utilizando RaSH), e também sobre o proteoma de neurônios hipocâmpais em cultura, utilizando eletroforese de proteínas em gel bidimensional seguido pela identificação dos peptídeos resultantes em espectrômetro de massas.

2.1 Análise de expressão gênica diferencial em neurônios hipocampais tratados com lítio

Nos últimos anos, vêm sendo desenvolvidas metodologias que permitem a análise de expressão gênica em larga escala, tais como SAGE, SSH e microarranjos de cDNAs. Essas técnicas permitem identificar genes diferencialmente expressos entre duas situações biológicas estudadas indicando genes que participem do processo investigado. Diante da importância do lítio no tratamento de doenças neuropsiquiátricas, buscamos identificar genes regulados por este sal nas células neuronais e assim revelar genes relacionados com a neuroproteção ou com o processo regulatório que observamos previamente.

Para isto, utilizamos o método de RaSH (do Inglês, *Rapid Subtractive-Hybridization*), descrito por Jiang e colaboradores (2000). RaSH é uma poderosa técnica que permite comparar duas “populações” de RNA mensageiro, gerando clones referentes a genes preferencialmente expressos em uma das populações estudadas. Optamos pelo RaSH pois, além de este ser um processo de subtração de cDNA significativamente simplificado, permite uma subtração eficiente a custos reduzidos e com menor quantidade de RNA.

2.1.1 Metodologia

2.1.1.2 Cultura de Neurônios

O protocolo de cultura de neurônios foi feito como descrito anteriormente no capítulo 1, vide seção 1 (Mendes et al., 2008), em *Methods: Treatment of primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons with LiCl*. Porém nos ensaios de RaSH utilizamos apenas neurônios hipocampais e a concentração de 0,2mM de LiCl.

2.1.1.3 RaSH (“*Rapid Subtractive-Hybridization*”)

Os RNAs transcritos a serem subtraídos foram obtidos de duas populações distintas de cultura de neurônios de hipocampo de rato: culturas não-tratadas com lítio, e culturas tratadas com LiCl dose de 0,2mM (Figura 10).

Figura 10: Esquema do protocolo de RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*).

- Síntese de cDNA

A partir de 25µg de RNA extraído de cada uma das culturas (controle e tratada com lítio), realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) dos respectivos RNAs, utilizando 200U da enzima *Superscript II RTTM* (Invitrogen, CA, USA) e com 0,5µg/mL de oligo dT₁₂₋₁₈ para a síntese da primeira fita e 4µU de *E.coli* DNA Polimerase, 10U de *E.coli* DNA ligase e 2U de *E.coli* Rnase H, para obter o cDNA de dupla fita. Em seguida, os cDNAs foram checados através de PCR com primers para β-actina para avaliar a qualidade da síntese.

-Digestão e Ligação dos Adaptadores

A população de nosso interesse, isto é, aquela de onde pretendemos subtrair os transcritos diferencialmente expressos, chamamos de *tester* (no nosso caso a cultura hipocampal tratada com 0,2mM de LiCl) e a outra população de referência chamamos de *driver* (no nosso caso a cultura hipocampal sem tratamento). O *tester* e o *driver* são digeridos com a enzima *MboI*, com posterior extração com fenol/clorofórmio, originando sítios no cDNA que são complementares aos adaptadores. Os cDNAs digeridos foram então ligados aos adaptadores XDPN-14 (CTGATCACTCGAGA) e XDPN-12 (GATCTCTCGAGT) em 8µl de tampão ligase e submetidos as seguintes condições: 55°C por 1min, 52°C por 2min. A partir desta temperatura a cada 2 minutos a temperatura foi reduzida em dois graus até atingir 30°C. A partir deste ponto, a cada 4 minutos a temperatura também foi reduzida outros dois graus até atingir 14°C. Em seguida foram adicionados 3µl de T4 ligase (40U/µl) em cada tubo os quais foram incubados a 14°C overnight para a reação de ligação.

- PCR e Purificação do Produto de PCR

Após a reação de ligação, as amostras foram diluídas em 100µl de 10mM Tris/1mM EDTA. Em seguida foram realizadas 25 reações de PCR (1 ciclo de 5min a 72°C, 25 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 55°C, 1min a 72°C e um ciclo de 3min a 72°C) por amostra onde foi utilizado 1µl do produto de ligação e primer XDPN-18 (CTGATCACTCGAGAGATC) que se liga aos adaptadores. O volume final de cada reação foi de 50µl e ao finalizar as reações, todos os produtos de PCRs (para cada amostra) foram misturados, seguido de extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Ao final, o *pellet* ressuspensionado em 120µl de LoTE.

- Digestão do *Tester* e *Driver*

Como fizemos dois tipos de subtração digerimos 10µg da amostra *tester* e *driver* com 10U/µl de enzima *XhoI*.

- Subtração

Fizemos dois tipos de subtração: hibridização-1 e hibridização-2. Primeiramente fizemos a hibridização-1, 100ng do produto digerido *tester* foram misturados a 3µg da amostra *driver* sem digerir. Nesta etapa, as seqüências presentes apenas na amostra *tester* tendem a formar duplo-híbrido *tester-tester*, enquanto aquelas que não são diferencialmente expressas formam principalmente híbridos *tester-driver*. Os híbridos *tester-tester* geram fitas com sítios para a enzima de restrição *XhoI* nas duas extremidades, o que permite sua amplificação por PCR.

Depois fizemos a hibridização-2, 100ng do produto digerido *driver* foram misturados a 3µg da amostra *tester* sem digerir. Esta segunda hibridização servirá apenas como controle da

eficiência do processo de subtração. As duas hibridizações foram realizadas em 10µl de solução de hibridização (0,5M NaCl; 50mM Tris, pH7,5; 0,2% SDS; formamida 40%) e após desnaturação (100°C – 5min) a solução foi incubada a 42°C durante 48 horas. Esta subtração baseia-se inicialmente na separação das fitas do cDNAs tanto do *tester* quanto do *driver* (100°C) e posterior hibridização entre as mesmas (42°C). Conseqüentemente as cópias de cDNAs que forem exclusivas do *tester* e do *driver* serão as únicas cópias de cDNA com sítios *XhoI* nas extremidades.

- Clonagem e Transformação Bacteriana

Quatro microlitros da mistura de cada subtração foram clonados em 1µg de plasmídeo pZero-1 (Invitrogen) digerido com *XhoI*, por 3 horas a uma temperatura de 16°C. Em seguida, os plasmídeos foram inseridos em bactérias eletro-competentes. Para isto, foram adicionados 2µl da reação de ligação à uma alíquota de 40µl de bactérias eletro-competentes e a mistura foi transferida para cubetas de 0,1cm previamente incubadas em gelo. As cubetas foram inseridas em um eletroporador ajustado para os parâmetros de 1,8kV e 5ms de pulso. Logo após a descarga elétrica foram adicionados 1ml de meio *Superbroth* à mistura a qual foi então mantida em agitador a 37°C, 200rpm. Após 1 hora as bactérias foram distribuídas (200µl cada) em placas com meio 2XYT com 50µg/ml de antibiótico ZeocinaTM. Após o inóculo, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16horas para obtenção das colônias.

- Seqüenciamento

Para realizarmos o seqüenciamento dos clones, as colônias transformadas foram crescidas em placas de 96 poços, do tipo *deep-well*, contendo 120µl de SOB com 50µg/ml de ZeocinaTM e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. No dia seguinte, 1µl de cada inóculo foi utilizado como molde nas reações de PCR. Para amplificação, foram utilizados 20µM de cada iniciador (M13F/M13R), 0,2mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1x PCR buffer e 0,1U de Taq DNA polimerase, em volume total de 10µl de reação. O seqüenciamento das amostras foi realizado utilizando o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Version 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A separação dos vários fragmentos de DNA formados e a leitura da fluorescência foram realizados em aparelho ABI3100 (Applied Biosystems).

2.1.1.4 Validação dos genes encontrados por qPCR

A síntese de cDNA e a análise da expressão gênica dos genes selecionados (Tabela 5) foi feita como descrito anteriormente no capítulo 1, vide seção 1 (Mendes et al., 2008), em *Methods: cDNA synthesis e gene expression analyses by quantitative PCR*.

Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos usados para qPCR

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')
<i>Ntrk2</i>	F-AGTGCTGATGGCAGAGGGTA
	R-GATGGGCAACATTGTGTGG
<i>Stm1</i>	F-AGCAAAATGGCAGAGGAGAA
	R-TTAGTCAGCCTCGGTCTCGT
<i>Apc</i>	F- GAGCACAGCGAAGAATAGCC
	R- GCTTTCTGCCACTCCTTGAC
<i>Akt3</i>	F-TCATTGCTTTCAGGGCTCTT
	R-TGGACACTTTTCAGGTGGTG
<i>Taf11</i>	F-AAGCAGAAGGTGGACGAAGA
	R-CTCCCCATTTCTCACACACA
<i>Actb</i>	F- GTCTTCCCCTCCATCGTG
	R- AGGATGCCTCTCTTGCTCTG
<i>Ubc</i>	F-AAGGTCAAACAGGAAGATACTCGT
	R-AAACTAAGACACCTCCCCATCA

2.1.2 Resultados e Discussão

Duas bibliotecas, denominadas *tester* e *driver*, foram construídas a partir de populações de mRNA de culturas de hipocampo tratadas com 0,2mM de lítio e sem tratamento, respectivamente. Posteriormente, frações das duas bibliotecas foram isoladas, purificadas e ligadas em vetor plasmidial para posterior eletroporação e seqüenciamento dos clones.

Obtivemos um total de 649 seqüências, sendo 236 derivadas da biblioteca *tester* e 413 derivadas da biblioteca *driver*. A partir da comparação das seqüências geradas contra o banco de dados público de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando as ferramentas Blastn e BlastX, encontramos um total de 106 genes divididos entre conhecidos e preditos nas bibliotecas (Tabela 6). Genes identificados nas duas bibliotecas, ou não subtraídos, são eliminados das análises posteriores, como por exemplo, o gene da tubulina (isoformas a1, b2 e b5), totalizando um total de 18 genes excluídos. Nas duas bibliotecas foram encontrados um total de 88 genes com pelo menos um clone ($f=1$) em uma das bibliotecas. Quando selecionados os genes com pelo menos dois clones ($f \geq 2$) em uma das duas bibliotecas, esse número foi reduzido para 10 genes.

Tabela 6 - Genes isolados com RaSH

#	de	Clones		
Bibliotecas				
Tester	Driver	Acc Number	Descrição	
0	1	NM_031620.1	<i>3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh)</i> ,	
1	0	NM_031144.2	<i>Actin, beta (Actb)</i> ,	
0	1	NM_022681.2	<i>Activity-dependent neuroprotective protein (Adnp)</i>	
1	0	NM_053837.1	<i>Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit (Ap2m1)</i> ,	
1	0	NM_019359.1	<i>Calponin 3, acidic (Cnn3)</i>	
1	0	NM_022597.2	<i>Cathepsin B (Ctsb)</i>	
1	0	NM_013087.1	<i>CD 81 antigen (Cd81)</i>	
1	0	NM_001012036.1	<i>Charged amino acid rich leucine zipper 1 (Crlz1)</i> ,	
1	0	NM_017067.1	<i>Choroideremia (Chm)</i> , RAB geranylgeranyl transferase component A	
0	1	NM_001003929.1	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor (Cntfr)</i>	
1	0	NM_019299.1	<i>Clathrin, heavy polypeptide (Hc) (Cltc)</i>	
0	2	NM_022245.1	<i>Cytochrome b-5 (Cyb5)</i> , mRNA >dbj D13205.1 RATCYTB5 Rattus norvegicus mRNA for cytochrome b5	
1	0	NM_053343.2	<i>Double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1 (Dcamk1)</i>	
0	1	NM_021776.1	<i>Endothelin converting enzyme-like 1 (Ecel1)</i>	
0	1	NM_001081056.1	<i>Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs) (Xpot)</i> , Mus musculus	
0	1	NM_031833.2	<i>Expressed in non-metastatic cells 2 (Nme2)</i> ,	
1	0	NM_134386.1	<i>G protein-coupled receptor associated sorting protein 1 (Gprasp1)</i> , for Per1 interacting protein of the suprachiasmatic nucleus, complete cds	
1	0	NM_022865.2	<i>Gephyrin (Gphn)</i> , mRNA	
0	1	NM_010298.3	<i>Glycine receptor, beta subunit (Glrβ)</i> , Mus musculus	
0	2	NM_153629.1	<i>Heat shock protein 4 (Hspa4)</i>	
0	1	NM_024351.2	<i>Heat shock protein 8 (Hspa8)</i> , mRNA	
1	1	AF307840.1	<i>Hemoflavoprotein b5/b5r mRNA</i> , complete cds	
1	0	NM_057141.1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Hnrpk)</i>	
0	1	AJ851868.3	<i>Immunoglobulin heavy chain locus constant region and partial variable region, strain 129/Sv Mus musculus</i>	
1	0	NM_008449.2	<i>Kinesin family member 5C (Kif5c)</i> , Mus musculus	
1	0	NM_012771.2	<i>Lysozyme (Lyz)</i> ,	
1	0	NM_019149.2	<i>Matrin 3 (Matr3)</i> ,	
1	0	NM_010825.2	<i>Myeloid ecotropic viral integration site-related gene 1</i> , Mus musculus	
2	0	NM_012731.1	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 (Ntrk2)</i> ,	
1	0	NM_177906.4	<i>Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like (Opcml)</i> , Mus musculus	
0	1	NM_145085.1	<i>Prenylcysteine oxidase 1 (Pcyox1)</i> , mRNA	
2	0	NM_053999.2	<i>Protein phosphatase 2, , alpha isoform (Ppp2r2a)</i>	
3	0	AM420303.1	<i>Proteus mirabilis tnpA gene, insA gene, insB gene and blaCTX-M-32 gene, isolate PM1</i>	
1	0	NM_053439.1	<i>RAN, member RAS oncogene family (Ran)</i> ,	
1	0	NM_017166.1	<i>S stathmin 1 (Stmn1)</i> , mRNA	
1	0	NM_182951.1	<i>Serine incorporator 1 (Serinc1)</i> ,	
1	0	NM_001009704.1	<i>Signal-induced proliferation-associated 1 like 2 (Sipa1l2)</i>	
0	2	NM_001014240.2	<i>Similar to liver regeneration-related protein LRRG07 (LOC364773)</i> , mRNA >dbj AB221345.1 Rattus norvegicus TBEP1 mRNA for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, complete cds	
1	0	NM_130738.1	<i>SNRPN upstream reading frame (Snurf)</i> ,	
0	1	NM_009181.1	<i>ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (St8sia2)</i> , Mus musculus	
1	0	NM_031841.1	<i>Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (Scd2)</i> ,	
0	1	NM_001005534.1	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein (Sdhc)</i> ,	

Continua

Tabela 6 (Continuação)

Tester	Driver	Acc Number	Descrição
0	1	NM_001008350.1	TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (Taf11),
0	1	NM_031575.1	Thymoma viral proto-oncogene 3 (Akt3), mRNA
3	0	NM_031136.1	Thymosin, beta 4 (Tmsb4x)
1	0	NM_017103.1	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (Tceb3)
1	0	NM_031549.1	Transgelin (Tagln),
1	0	BC099207.1	Translocation protein 1
2	0	NM_022922.2	Triosephosphate isomerase 1 (Tpi1),
0	1	NM_031137.1	Tripeptidyl peptidase II (Tpp2)
1	1	NM_022298.1	Tubulin, alpha 1 (Tuba1), mRNA >emb V01227.1 RNATUBZ Rat mRNA encoding alpha-tubulin
2	1	NM_001013886.2	Tubulin, beta 2b (Tubb2b)
1	1	NM_173102.1	tubulin, beta 5 (Tubb5),
1	0	NM_026521.3	Zinc finger protein 706, Mus musculus
1	0	XM_622559.3	Adenomatosis polyposis coli (Apc), Mus musculus
0	1	AK138173.1	Adult male hypothalamus cDNA, RIKEN full-length enriched library, Mus musculus
1	0	XM_001056221.1	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (predicted) (Mki67_predicted), mRNA
0	1	XM_001055088.1	Asparagine-linked glycosylation 2 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase) (Alg2), mRNA
1	0	XM_001067335.1	Cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 (predicted) (Clptm1_predicted), mRNA
1	0	XM_001077667.1	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1
1	0	XM_001062787.1	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57 (Dhx57), mRNA
1	0	XM_001065445.1	Diacylglycerol kinase
1	0	XM_001079906.1	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa (Eif3s8), mRNA
1	0	XM_001076854.1	Exportin 6 (Xpo6), mRNA
0	1	XM_001074110.1	Feminization 1 homolog b (C. elegans) (predicted) (Fem1b_predicted), mRNA
1	0	XM_001079457.1	Hypothetical protein MGC17943 (predicted) (RGD1563325_predicted), mRNA
0	1	XM_001059656.1	Intracellular protein transport like (XM453) (predicted) (RGD1307525_predicted), mRNA
1	0	XM_218062.4	LATS homolog 1 (predicted) (RGD1564085_predicted), mRNA
1	0	BC085893.1	LOC306766 Rattus norvegicus hypothetical LOC306766, mRNA (cDNA clone MGC:94694 IMAGE:7192798), complete cds
1	0	XM_001054026.1	Mutated in bladder cancer 1 (predicted) (RGD1561942_predicted), mRNA
1	0	XM_001077876.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3 (predicted) (Ndufs3_predicted), mRNA
0	1	XM_001067975.1	NCK-associated protein 1 (Nckap1), mRNA
1	0	XM_575592.2	Pol(yrC)-binding protein 1 (Alpha-CP1)
0	3	XM_001081435.1	RAB5C, member RAS oncogene family (predicted) (Rab5c_predicted), mRNA
0	1	XM_001061087.1	Retinoblastoma binding protein 4
1	0	XM_001066376.1	RIKEN cDNA 1810055E12 (predicted) (RGD1308326_predicted), mRNA
1	0	XM_975045.1	RIKEN cDNA 5730601F06 gene, transcript variant 2 (5730601F06Rik), mRNA Mus musculus
1	0	NM_001017463.1	RIKEN cDNA 9030624J02 (LOC361635), mRNA >gb BC083805.1
1	0	XM_001070327.1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9 (LOC498358), mRNA
0	1	XM_001078687.1	Structural maintenance of chromosome 3 (Chondroitin sulfate proteoglycan 6)
0	1	XM_001058239.1	Synaptogyrin 3 (predicted) (Syngr3_predicted), mRNA
1	0	NM_177907.2	Transcript variant 1, Mus musculus
1	0	XM_001072139.1	Translation initiation factor 4 gamma, 2 (Eif4g2)
2	0	XM_001074204.1	Ubiquitin specific protease 47 (predicted), transcript variant 2 (Usp47_predicted),
1	0	XM_001067198.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 (predicted) (Ube2l3_predicted), mRNA
0	1	XM_001064954.1	Vacuolar protein sorting 36 (yeast) (predicted) (Vps36_predicted), mRNA
0	1	XM_215278.4	WW domain binding protein 5 (predicted) (Wbp5_predicted), mRNA
1	0	XM_001062824.1	Zinc finger protein 644 (predicted) (Zfp644_predicted), mRNA

NOTA: Abreviações: #- Número. Acc Number - Número de acesso ao banco de nucleotídeos do NCBI.

O estudo feito por Bosetti e colaboradores (2002) demonstrou a análise da expressão gênica utilizando *microarray* em cérebro de ratos submetidos à administração oral de lítio por sete (subagudo) e 42 dias (crônico). Esse estudo utilizou-se de *microarray* de cDNA com filtros de alta-densidade, representando mais de 4.000 genes humanos, sendo o primeiro estudo de avaliação dos efeitos do lítio na expressão gênica global do cérebro. Devemos notar que estes autores utilizaram um *array* de genes humanos para avaliar a expressão de genes de ratos. Segundo os autores isto foi feito com base no conceito de que existe uma grande conservação de genes entre mamíferos de espécies diferentes (Andersson, et al., 1996; Venter et al., 2001). Além disto, as outras razões alegadas são a limitada caracterização de genes de ratos (especialmente a mais de cinco anos, quando o artigo foi publicado) e a alta similaridade entre os transcritos de ratos e humanos (de cerca de 85% - Makalowski e Boguski, 1998) o que deveria reduzir o problema da correta hibridização de sondas heterólogas. No entanto, este aspecto é uma clara limitação desta publicação.

O estudo demonstrou que o lítio tem em geral muito mais efeitos depressivos que estimulatórios na transcrição gênica cujos produtos têm uma variedade de funções. Foi descrito que o tratamento crônico com lítio diminui os níveis de mRNA de muitos genes incluindo o hormônio paratireóide, receptores de interferon gama, proteínas quinases, segundos mensageiros, vários fatores de transcrição, enzimas envolvidas no ciclo do fosfatidilinositol e no metabolismo energético. Entre estes genes de expressão reduzida, seria plausível a identificação de algum fator responsável pela transcrição de *Gsk3b*, no entanto, nenhum dos fatores de transcrição encontrados com expressão alterada nesse estudo, foi predito como possível regulador da transcrição de *Gsk3b*. Deste modo, iniciamos uma abordagem exploratória por meio do RaSH.

Além de ter o potencial de revelar um achado importante para explicar a regulação de *Gsk3b*, a identificação de genes modulados por lítio pode proporcionar maiores informações a cerca da patobiologia de doenças como o TAB, além de auxiliar a esclarecer os efeitos neuroprotetores do lítio. A estratégia de bibliotecas subtrativas parcialmente resolve o problema das diferenças em abundância de mRNA através da incorporação de um passo de amplificação que normaliza (equaliza) a abundância da sequência durante o curso da subtração pela cinética normal de hibridização (Diatchenko et al., 1996).

Cabe notar que em nossas análises com RaSH, não identificamos nenhum dos genes apontados por Bosetti et al., 2002. As possíveis explicações para o fato seriam: quanto aos animais, à forma de administração do lítio e quanto ao tecido analisado. O estudo de Bosetti foi feito em cérebro total de ratos adultos submetidos à administração oral de lítio, já em nosso estudo o tratamento foi feito em cultura de células hipocâmpais de embriões de rato. Porém

identificamos genes das mesmas vias metabólicas e até mesmo com funções protéicas semelhantes. Como por exemplo, genes de resposta ao stress celular (*heat shock protein*), fatores de transcrição (*Creb-binding protein*, *zinc finger protein*), entre outros como *citocromo c*, *kinesin-related protein* (*kif*) e *RAS oncogene family*.

2.1.2.1 Genes selecionados

As proteínas codificadas pelos 88 genes sugeridos por RaSH foram avaliadas de acordo com sua função por meio do Gene Ontology (GO - <http://www.geneontology.org/>). Dentre estes, encontramos 26 genes de maior relevância no contexto da DA ou no contexto lítio/GSK-3, os quais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Genes isolados com RaSH classificados de acordo com a função descrita pelo *Gene Ontology* (G.O.) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database* (KEGG).

	Símbolo	Função G.O./ KEGG
Genes com expressão reduzida após o tratamento com lítio	NM_031620.1 <i>Phgdh</i> - 3-phosphoglycerate dehydrogenase	Desenvolvimento cerebral
	NM_022681.2 <i>Adnp</i> - Activity-dependent neuroprotective protein	Inibição da agregação de A β ; transcrição
	NM_021776.1 <i>Ecell</i> - Endothelin converting enzyme-like 1	Neuroproteção
	NM_031833.2 <i>Nme2</i> - Expressed in non-metastatic cells 2	Regulação negativa da apoptose
	NM_010298.3 <i>Glr3</i> - Glycine receptor, beta subunit	Desenvolvimento do SNC; Transmissão sináptica
	NM_153629.1 <i>Hspa4</i> - Heat shock protein 4	Antiapoptótico; citoprotetor
	NM_009181.1 <i>St8sia2</i> - ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	Adesão neuronal; neurogênese
	NM_001008350.1 <i>Taf11</i> -TATA box binding protein (TBP)-associated factor (Taf11)	Regulação da transcrição; site de predição p/ <i>Gsk3b</i>
	NM_031575.1 <i>Akt3</i> - Thymoma viral proto-oncogene 3	PKB-AKT apoptose / apoptose; Via de sinalização de MAPK
	XM_001074110.1 <i>Fem1b</i> - Feminization 1 homolog b	Indução de apoptose
	XM_001067975.1 <i>Nckap1</i> - NCK-associated protein 1	Apoptose; Desenvolvimento do SNC
	XM_001081435.1 <i>Rab5c</i> - RAB5C, member RAS oncogene family	Atividade GTPase

Continua

Tabela 7 (Continuação)

Genes com expressão aumentada após o tratamento com lítio	NM_019359.1 <i>Cnn3</i> - <i>Calponin 3, acidic</i>	Atividade sináptica
	NM_022597.2 <i>Ctsb</i> - <i>Cathepsin B</i>	Regulação da apoptose
	NM_013087.1 <i>Cd81</i> - <i>CD 81 antigen</i>	Ativação da atividade de MAPK
	NM_001012036.1 <i>Crlz1</i> - <i>Charged amino acid rich leucine zipper 1</i>	Desenvolvimento cerebral; desenvolvimento de processos
	NM_053343.2 <i>Dcamk1l</i> - <i>Charged amino acid rich leucine zipper 1</i>	Desenvolvimento do SNC; axogênese; migração neuronal
	NM_134386.1 <i>Gprasp1</i> - <i>G protein-coupled receptor associated sorting protein 1</i>	Sobrevivência neuronal
	NM_012731.1 <i>Ntrk2</i> - <i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>	Ativação por lítio
	NM_053999.2 <i>Ppp2r2a</i> - <i>Protein phosphatase 2, alpha isoform</i>	Transdução de sinal / Via de sinalização de Wnt
	NM_012731.1 <i>Ntrk2</i> - <i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>	Ativação por lítio
	NM_017166.1 <i>Stmn1</i> - <i>Stathmin 1</i>	Migração neuronal / Via de sinalização de MAPK
	NM_031136.1 <i>Tmsb4x</i> - <i>Thymosin, beta 4</i>	Regulação de migração delular
	NM_022922.2 <i>Tpi1</i> - <i>Triosephosphate isomerase 1</i>	Glicólise; Gluconeogênese
	XM_622559.3 <i>Apc</i> - <i>Adenomatosis polyposis coli</i>	Ligação a β -catenina; desenvolvimento de neuritos / Via de sinalização de Wnt
	XM_001074204.1 <i>Usp47</i> - <i>Ubiquitin specific protease 47</i>	Ubiquitina ; Doença de Huntington
	XM_001067198.1 <i>Ube2l3</i> - <i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3</i>	Ubiquitina / Doença de Parkinson

Esse tipo de análise nos direcionou no momento de selecionar os genes que deveriam ser estudados e para os quais buscaríamos validação. Além disto, esses candidatos poderiam auxiliar na possível determinação de vias metabólicas que poderiam estar alteradas por meio do tratamento com lítio e servindo como um norteador na compreensão de seu mecanismo neuroprotetor.

- Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (*Ntrk2*) - NM_012731.1

O *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), desempenha importante papel na regulação, sobrevivência e plasticidade neuronal durante o desenvolvimento (Huang e Reichardt, 2001; McAllister et al., 1999; Sofroniew et al., 2001). Quando BDNF se liga a seu receptor, *Ntrk2*, ele causa a sua dimerização, ativação de quinases e a fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina do mesmo. Logo a fosforilação do resíduo de tirosina na posição 490 (Tyr490) resulta na ativação da via de sinalização de PI3-kinase/AKT durante o recrutamento da proteína, Shc (Patapoutian e Reichardt, 2001).

Esses e outros indícios mostram que BDNF/Ntrk2 mediará muitos eventos moleculares induzidos por lítio. Sendo assim, Hashimoto e colaboradores (2002) analisaram os efeitos da proteção do lítio contra a excitotoxicidade do glutamato em cultura primária de córtex de rato. O pré-tratamento tanto com lítio ou BDNF protegeram os neurônios corticais da toxicidade do glutamato. O tratamento com lítio aumentou os níveis de BDNF nas células em 3 dias e a fosforilação de Ntrk2 no resíduo de Tyr490 em 5 dias, sugerindo que o tratamento prolongado com lítio aumentaria a expressão e secreção de BDNF levando a ativação do receptor de Ntrk2.

Mais ainda esse mesmo grupo mostrou que lítio assim como drogas antidepressivas aumentam BDNF por meio da sinalização de Ntrk2 no cérebro, particularmente em hipocampo e córtex cingulado anterior (Hashimoto et al., 2004; Castren, 2004). Outros estudos também mostraram que o tratamento prolongado com lítio foi capaz de aumentar ou modular a expressão gênica de BDNF (Einat et al., 2003; Jacobsen and Mork, 2004; Fukumoto et al., 2001; Hashimoto et al., 2002; Angelucci et al., 2003).

Ainda que lítio tenha se mostrado capaz de induzir algumas cascatas de sinalização *downstream* a TrkB em hipocampo e córtex de rato (Einat et al., 2003; Mai et al., 2002; Nemeth et al., 2002) e fosforilar Ntrk2 em culturas primárias de neurônios corticais (Hashimoto et al., 2002) não existem estudos que comprovem sua ativação direta na expressão gênica de Ntrk2.

- Sathmin1 (Stm1) - NM_017166.1

O uso de oligonucleotídeos antisense para inibir a expressão de *Stm1* mostrou que essa depleção previne a diferenciação estimulada por *nerve growth factor* (NGF) de células PC12 em células semelhantes a neurônios sem ativação da expressão de genes NGF. Mais ainda a fosforilação de stathmin em células PC12, induzida por NGF, depende da atividade de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Sendo assim, stathmin pode ser o componente essencial da indução de NGF na cascata de sinalização de MAPK e desempenhar um importante papel durante a diferenciação de neurônios em desenvolvimento (Cardinaux et al., 1997). Outros estudos também mostraram que stathmin é substrato para MAPK *in vivo* (Leighton et al., 1993; Marklund et al., 1993).

Sabendo do envolvimento de stathmin nas vias de sinalização de MAPK e possivelmente na diferenciação neuronal torna-se relevante o estudo da expressão desse gene ao longo do tratamento com lítio.

- Adenomatosis polyposis coli (*Apc*) - NM_012499.1

A via de WNT é uma via altamente conservada e crítica por promover o desenvolvimento embrionário (Nusse e Varmus, 1992; Parr e McMahon, 1994; Nusse, 1997). Evidências recentes apontam que essa via e uma de suas enzimas-chave a GSK3b podem desempenhar um importante papel na regulação da plasticidade sináptica, sobrevivência celular e ritmos circadianos no sistema nervoso central (Gould e Manji et al., 2002). O lítio pela inativação da GSK3b atua como um regulador positivo da via de WNT (Hedgepeth et al., 1997; Klein e Melton, 1996; Stambolik et al., 1996). Desde os primeiros achados de que lítio inibe GSK3 (Klein e Melton, 1996) especula-se sobre a possibilidade do seu uso como uma ferramenta para avaliar a função de WNT.

Quando há estímulo via WNT, a fosforilação de β -catenina pelo complexo GSK3, axin e Apc é de certa forma reduzida. Isso promove um enriquecimento de β -catenina no citosol e núcleo, onde ela se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF para aumentar a expressão dos genes alvos. Vários alvos de β -catenina na ativação transcricional já foram identificados. Dentre eles um dos genes regulador do ciclo celular em mamíferos, a Ciclina D (Shtutman et al., 1999). Em alguns tipos de câncer, mutações em Apc, axin ou β -catenina interrompem a degradação de β -catenina levando a uma ativação inapropriada de genes alvos de WNT. Embora seja essencial para a degradação de β -catenina o papel de Apc no complexo de degradação é pouco conhecido. Apc contém repetições de 15 e 20 aminoácidos que auxiliam a ligação a β -catenina (Polakis, 2000). A fosforilação de Apc por CK1 e GSK3b aumenta a habilidade de Apc de se ligar e suprimir β -catenina (Rubinfeld et al., 1997; Rubinfeld et al., 2001).

Deste modo, a correlação entre GSK3 e a via WNTs/ β -catenina é clara. Como nossos resultados demonstraram que lítio afeta diretamente a transcrição de GSK3b, um estudo mais completo dos efeitos de lítio nesta via é justificado. Sabendo do envolvimento direto de Apc no complexo de degradação de β -catenina e via de WNT é relevante o estudo da expressão desse gene mediante a inibição de GSK3b por lítio na tentativa de buscar compreender o mecanismo de ação do lítio em vias metabólicas das quais GSK3b faz parte.

- TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (*Taf11*) - NM_001008350.1

Este gene foi selecionado diante dos achados anteriormente apresentados, referentes à da inibição da expressão de *Gsk3b* após o tratamento das culturas de neurônios hipocâmpais com lítio. Sendo assim avançamos nossos estudos com o intuito de identificar fatores de transcrição

que expliquem nossos achados. Para isto, buscamos identificar na lista de genes encontrados, algum fator de transcrição que pudesse se ligar ao promotor de *Gsk3b*.

Usando alguns dos sites disponíveis na WEB de predição de promotor (Promoter Scan <<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>>; DBD: Transcription factor prediction DataBase <<http://dbd.mrc-lmb.cam.ac.uk/DBD/index.cgi?Home>> ; TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites <<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>>; TRANSFAC®- Gene Transcription Factor Database <http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?transfac>) fizemos a varredura de alguns fatores de transcrição preditos por esses programas contra os fatores de transcrição encontrados em nossa biblioteca de genes gerados por RaSH. Nós identificamos por meio do programa (TFSEARCH) o fator TATA box binding protein (TBP), também presente em nossa biblioteca, representado por um clone na biblioteca controle, como sendo um possível fator de transcrição de *Gsk3b*. Sendo assim partimos para avaliar a expressão gênica desse fator com intuito de encontrar possíveis explicações para a regulação gênica de *Gsk3b* por lítio.

2.1.2.2 Validação por qPCR

Os gráficos a seguir apresentam uma comparação dos valores de expressão que observamos para os genes selecionados (Figura 11)

Figura 11 – Efeito do tratamento de LiCl na expressão de *Ntrk-2*, *Stm1*, *Taf11* e *Apc* em cultura de hipocampo. Neurônios hipocámpais foram tratados *in vitro* por 120 horas com doses diferentes de LiCl (2mM a 0,2mM). Os níveis de expressão dos diversos genes foram comparados aos obtidos em cultivos celulares sem a adição de lítio (controles). As barras representam medianas dos níveis de expressão de mRNA de (A) *Ntrk-2*, (B) *Stm1*, (C) *Taf11* e (D) *Apc* em neurônios tratados com LiCl em relação a quantidade de mRNA do controle de pelo menos três ensaios distintos. Análise One-Way ANOVA revelou que o tratamento com LiCl resulta em um aumento estatisticamente significativo na expressão de *Ntrk-2* em sintonia com os resultados obtidos por RaSH. * $p=0,0034$.

Os resultados de três ensaios independentes de cultura de neurônios hipocámpais mostraram que o tratamento com LiCl por cinco dias resultou em um aumento significativo nos níveis de mRNA do gene de *Ntrk2* em $39 \pm 16\%$ ($p=0,0034$) no tratamento com lítio 2mM em relação ao controle. Porém não houve diferença estatística significativa na expressão dos demais genes selecionados (*Apc*, *Taf11* e *Stm1*), que provavelmente seria falsos-positivos apontados por RaSH.

Diante dos efeitos neuroprotetores do lítio Hashimoto e colaboradores (2002) investigaram o papel das cascatas de sinalização via *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)/Ntrk2 mediante a neuroproteção de lítio contra a toxicidade do glutamato em neurônios corticais. Estes

autores demonstraram que o pré-tratamento com lítio ou BDNF protegeu os neurônios corticais de rato contra a toxicidade do glutamato. O tratamento com lítio aumentou os níveis de BDNF após três dias e a fosforilação de Ntrk2 no Tyr490 após cinco dias, sugerindo que a administração de lítio por longo tempo aumenta a expressão/secreção de BDNF, levando a uma ativação dos receptores Ntrk2. Desse modo nossos achados servem de apoio aos estudos de lítio e neuroproteção mostrando que lítio além de fosforilar Ntrk2 também é capaz de aumentar sua expressão.

Apesar de observarmos o efeito de lítio sobre a transcrição dos genes de *Gsk3b* e *Ntrk2* não observamos esse efeito sobre outros genes diretamente ligados à GSK-3 como *Taf11* e *Stm1*, importantes na patogênese da DA. Por outro lado, a redução observada nos níveis de mRNA de *Gsk3b*, aparentemente tem um efeito sutil sobre as demais proteínas da cascata como é o caso do gene de *Apc*. Sendo assim, no período de tratamento e nas doses de lítio empregadas não observamos maiores consequências transcricionais em alguns dos genes avaliado.

2.2 Análise de proteoma de neurônios hipocampus tratados com lítio

Na era pós-genômica tem ficado evidente que apenas a obtenção de seqüências genômicas completas não é suficiente para elucidar os processos biológicos (Pandey e Mann, 2000). Adicionalmente às informações obtidas pela análise do genoma, é preciso ter conhecimento, por exemplo, sobre quais proteínas estão realmente sendo expressas, quando e em quais níveis esta expressão ocorre além de eventuais modificações pós-transcricionais.

O termo proteômica foi inicialmente introduzido em 1995 e foi definido como sendo a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expresso numa célula ou tecido (Wilkins et al., 1996; Celis et al., 1996; Williams & Hochstrasser, 1997) em um dado momento. Diferente do genoma, e de modo similar ao transcriptoma, o proteoma tem natureza dinâmica e se altera frente a diferentes condições e estímulos. O estudo global destas alterações representa uma forma de investigar e integrar processos em sistemas vivos para melhor entender o funcionamento de uma célula ou tecido ao nível molecular.

A proteômica visa estudar a estrutura, função e o controle dos sistemas biológicos pela análise das várias propriedades das proteínas. Isto inclui a seqüência, abundância, atividade e estrutura das proteínas expressas por uma célula, assim como as modificações, interações e translocações sofridas por cada proteína.

Analogamente a proteômica, a transcriptômica se baseia na análise global de RNAs mensageiros (mRNA) presentes numa célula ou tecido. Neste caso, informações precisas sobre regulação transcricional são geradas, o que representa outro tipo de informação, pois mesmo que uma proteína não possa ser sintetizada sem seu mRNA estar presente, é possível que uma proteína esteja na célula quando seu mRNA não está mais presente e, ainda, é possível haver muito mRNA sem que haja tradução da mensagem em proteína. Devido a mecanismos pós traducionais de regulação de expressão gênica, a quantidade de proteína não é necessariamente proporcional a quantidade de seu mRNA correspondente.

Sendo assim, após a avaliação da expressão gênica diferencial ao longo do tratamento com lítio por meio da metodologia de RaSH nós partimos para a análise de proteoma das mesmas culturas tratadas com lítio. Essa metodologia foi baseada na técnica de eletroforese bidimensional, seguida da identificação das proteínas usando *Peptide Mass Fingerprinting mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) (Wilkins et al., 1997).

2.2.1 Metodologia

2.2.1.1 Preparação das amostras

Culturas de neurônios corticais e hipocampus, controle e tratadas com LiCl, foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS - *phosphate buffered saline*) e adicionado 1ml de tampão de lise celular RIPA (Assay Designs) contendo inibidores de protease (2µg/mL aprotinina, 2µg/mL leupeptina, 200µM sódio ortovanadato, e 1mM PMSF), por 15 minutos. Em seguida as células foram raspadas obtendo assim homogenatos de neurônios que foram centrifugados a 14.000xg por 10 minutos. Nos sobrenadantes contendo os lisados foi feita dosagem protéica seguida de precipitação com etanol:acetona:ácido acético (50:50:0,1 v/v/v) gelado em temperatura -80°C por 40 minutos, e depois centrifugadas a 14.000xg por 15 minutos permanecendo o *pellet* de proteínas concentradas.

2.2.1.2 Eletroforese de bidimensional (2DE)

A 2DE é um dos métodos disponíveis para separar misturas complexas de proteínas. Ela combina duas técnicas de separação baseadas em gel de poliacrilamida. A primeira separação (primeira dimensão) é a focalização isoeletrica (IEF), na qual as proteínas são separadas em um gradiente de pH até alcançarem a posição estacionária onde a carga total é zero (ponto

isoeletrico). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), separação esta baseada na massa molecular (MM) das proteínas. As proteínas são visualizadas diretamente no gel, resultando num perfil bidimensional de pontos (chamados *spots*), cada um contendo múltiplas cópias de uma proteína. A quantidade de proteína migrando em cada *spot* é quantificada baseando-se na intensidade e área do respectivo *spot*. A imagem do gel é então digitalizada e analisada densitometricamente por programas de computador.

Ao *pellet* concentrado de proteína preparado, contendo aproximadamente 600µg de proteína, em cada amostra, foi adicionado 350µl de solução contendo 7M uréia, 2M tiouréia, 2% (w/v) CHAPS, 2% ampholytes pH3-10, 70mM DTT e 0,001% de azul de bromofenol. Com exceção do CHAPS, que foi obtido da Sigma (St Louis, MO, USA), todos os outros reagentes foram obtidos da GE Biosciences (Uppsala, Sweden). As amostras foram aplicadas em gel *strip* com uma separação não-linear de pH3-10 (GE Biosciences). Após 12 horas de hidratação, inicia-se o processo de separação isoeletrica a 20°C, inicialmente por 1h a 500V, mais 1h de 1000V e então 10h a 800V em aparelho IPGphor (GE Biosciences), mantendo a corrente constante a 50 µA por *strip*. Os *strips* obtidos na primeira dimensão são submetidos a uma redução padrão (10min) e alcalinização (10min) antes de seguir a 2-DE. A eletroforese segunda dimensão (SDS-PAGE) foi feita em gel de poliacrilamida 12% corrida no sistema SE-600 conectada ao MultitempII sistema refrigerado (Amersham Biosciences). O *strip* IPG gel selou a superfície do gel de segunda dimensão usando 0,5% (w/v) agarose. A eletroforese foi feita a 60V por 1 hora seguida de corrente constante de 30mA por gel. As proteínas foram detectadas por corante *coomassie blue* coloidal.

2.2.1.3 Análise da Imagem

Após a coloração os géis foram scaneados com transmissão de 300dpi de resolução usando o Sharp Scanner JX. As imagens foram salvas como 8 bit TIFF files. O software ImageMaster 2D software 3.01 (Amersham Biosciences) foi usado na detecção, contagem e quantificação dos *spots*.

2.2.1.4 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massas (MS)

A identificação de proteínas presentes nos perfis de 2DE é um passo importante na análise de proteomas. De uma técnica puramente descritiva, a 2DE transforma-se numa poderosa

ferramenta integrada para análise estrutural e funcional de proteínas. Quando combinada à técnica de MS, a identificação é geralmente feita por correlação de dados experimentais obtidos de uma proteína com os conteúdos de bancos de dados de seqüências (geralmente de proteínas, cDNA, DNA genômico ou *expressed sequence tags* - ESTs). Vários tipos de dados podem ser usados para identificar proteínas por buscas em bancos de dados e, atualmente, existe uma grande variedade de técnicas que podem ser usadas para gerá-los. Na maioria dos casos, o processo começa por contar cada *spot* individualmente do gel 2DE. As proteínas nos *spots* são então submetidas à digestão no gel (*in-gel*) e a proteína é fragmentada, geralmente por digestão trípica e, em seguida, seus fragmentos são submetidos para análise por MS.

No espectrômetro, os peptídeos são ionizados, separados segundo suas razões massa/carga (m/z) e então detectadas. Em diferentes tipos de espectrômetros de massa os processos de ionização e separação ocorrem por diferentes princípios físicos. No caso as proteínas foram identificadas por MS usando o equipamento Q-TOF (Applied Biosystems). Usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) as seqüências dos peptídeos obtidas e foram comparadas com as seqüências de proteínas depositadas em bancos de dados públicos (NCBI).

2.2.2 Resultados e Discussão

Dentre as proteínas detectadas em gel, oito *spots* se mostraram diferencialmente expressos entre os géis após a análise das imagens de cada gel. Um gel representativo, indicando estes *spots*, é mostrado na figura 12. As proteínas desses *spots* foram então excisadas e submetidas à digestão trípica seguida da MS para posterior identificação (Figura 12 e Tabela 8).

Figura 12 – Perfil de Gel de proteína 2-D de cultura neurônios hipocâmpais de rato. As proteínas foram separadas com base no pI (pH3-10, eixo x) e massa molecular (kDa, eixo y). Os spots numerados foram identificados por MS (veja Tabela 8).

Tabela 8 – Identidade das proteínas extraídas dos *spots* e analisadas por MS

	Aumento (em vezes)	Spots	Acesso no Swiss-Prot	Nome da Proteína	pI (th)	Massa Molecular (th)	Similaridade
Proteínas reprimidas por lítio	2.876(Cont.)	1	Q6P9V9	<i>Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2)</i>	4.9	50152	25/107
	2.844(Cont.)	3	P14423	<i>Phospholipase A2, membrane associated precursor (GIIC sPLA2)</i>	9.2	16294	7/38
	2.956(Cont.)	6	O35827	<i>Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 3 (Fe65-like protein 2)</i>	7.5	54908	15/30
Proteínas induzidas por lítio	2.121(2mM)	4	P02769	<i>Serum albumin precursor</i>	5.8	69294	56/119
	2.215 (0.2mM)/ 2.099(2mM)	2&5	P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)</i>	6.0	62278	24/100
	2.654(2mM)	1	Q6P9V9	<i>Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2)</i>	4.9	50152	25/107
	2.951(0.2mM)	7	Q62698	<i>Dynein light intermediate chain 2, cytosolic</i>	5.5	54745	29/105
	3.223(0.2mM)/ 3.112(2mM)	8	Q6AYT0	<i>Quinone oxidoreductase (NADPH:quinone reductase) (Zeta-crystallin)</i>	8.4	34976	14/30

As imagens dos géis geradas por análises em software específico detectaram os *spots* que estão diferentes em abundância nos géis de cultura de neurônios hipocâmpais tratadas com lítio

em relação ao controle. A proteína que se encontra em quantidade igual ao controle e tratamento 2mM LiCl é a *Tubulin alpha-2 chain* (Figura 12, *spot* 1). Já os *spots* 3 e 6 (Figura 12) mostram um aumento de *Phospholipase A2, membrane associated precursor* (GIIC sPLA2) e *Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 3*, respectivamente, na cultura controle em relação aos tratamentos. Por outro lado o tratamento com lítio eleva a abundância das seguintes proteínas em relação ao controle: *Serum albumin precursor* (Figura 12, *spot* 4), *Dihydropyrimidinase-related protein 2* (DRP-2) (Figura 12, *spots* 2 e 5), *Dynein light intermediate chain 2* (Figura 12, *spot* 7), *Quinone oxidoreductase* (Figura 12, *spot* 8).

Interessantemente nossos achados de proteínas diferencialmente expressas vão de encontro a outros estudos de proteoma feitos com camundongos transgênicos para *Gsk3b*, modelo lítio-pilocarpina de epilepsia e proteoma de DA. Em estudo recente de Greene e colaboradores (2007) de análise de proteoma em um modelo lítio-pilocarpina de epilepsia verificamos a identificação de *Tubulin alpha-2 chain* bem como de *Dihydropyrimidinase-related protein 2* (DRP-2) sendo que esta última também encontra-se em maior de abundância no tratado em relação ao controle, e ainda mais reduzida em outro estudo de proteoma de DA (Sultana et al., 2007), o que reforça bastante a regulação dessa proteína por lítio. Encontramos ainda *Dynein light intermediate chain 2* que é relevante no contexto do lítio/GSK3b pois GSK3b é requerida para a ligação de BICD à dineína (Fumoto et al., 2006). Outro achado interessante foi a identificação de *Quinone oxidoreductase* (*NQO1*), pois já foi descrito que alterações na sua atividade estão associadas à DA. A inibição de *GSK3b* e por iRNA leva ao acúmulo nuclear de *Nrf2* e à ativação transcricional de *Nrf2 downstream* ao gene *NQO1* (Jain e Jaiswall, 2007).

Em síntese culturas de neurônios hipocâmpais de rato submetidas ao tratamento com lítio apresentaram diferenças específicas na abundância das proteínas que podem ser relacionadas às características clínicas de interesse no uso do lítio. Estudos ainda precisam ser feitos para verificar se essas alterações também ocorrem em nível de mRNA, além de novos géis com perfil mais básico para identificar outras proteínas ainda não detectadas nesse ensaio. Sendo assim, a identificação de proteínas relevantes no contexto do tratamento com lítio pode ser útil na compreensão de seu mecanismo de funcionamento.

3 CONCLUSÕES

LÍTIO E EXPRESSÃO DE GSK3

A presente tese apresentou evidências experimentais de que lítio pode afetar a regulação dos níveis de mRNA de *Gsk3b*. Nossos resultados, tanto em cultura de neurônios quanto *in vivo*, indicaram que a dosagem terapêutica e sub-terapêutica de lítio leva a uma redução de mRNA de *Gsk3b*. Observamos a redução de mRNA de *Gsk3b* em cultura primária de neurônios hipocâmpais de rato tratados com lítio. Essa redução foi vista de modo dose-dependente e exclusivo para células hipocâmpais.

Os mesmos efeitos foram vistos em hipocampo de ratos adultos tratados com lítio por 35 dias nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg. No entanto esses efeitos não foram observados no córtex frontal ou nos leucócitos desses animais.

Não observamos nenhum efeito na transcrição de genes relacionados diretamente a GSK3 ou a vias metabólicas ligadas a esta enzima, tais como: *Bace1*, *App*, *Psenen*, *Mapt*, *Ctnnb1*, *Wnt7a*, *Akt1*, *Inpp1*.

Na análise descritiva de *Western Blot* observamos um aumento da imunoreatividade de GSK3 na sua forma inativada, ou seja, fosforilada, que tende a aumentar ao longo do tratamento com lítio, aparentemente de modo dose-dependente, tanto em córtex como hipocampo e nas duas isoformas de GSK-3. Porém não observamos por *Western Blot* efeitos na alteração dos níveis protéicos de GSK-3b em hipocampo. Deste modo, nossos achados de redução de mRNA não foram corroborados pelas análises de expressão protéica de GSK-3b.

Os efeitos de lítio também foram vistos em pacientes com TAB que receberam tratamento crônico. Neste regime prolongado de tratamento, os pacientes que receberam lítio por um período médio de 6 anos, apresentaram uma redução na expressão de *GSK3b* em leucócitos, quando comparados ao grupo que não foi tratado com lítio. Avaliando a expressão em relação ao uso de lítio e outra medicação, no caso o valproato, encontramos que *GSK3b* ainda continua reduzido no grupo usuário de lítio mas o efeito significativo é perdido devido ao pequeno N amostral.

Numa análise sobre a influência frequência alélica e genotípica de *ApoE* nas duas populações de pacientes bipolares não encontramos diferenças significativas, e foi possível descartar que o status de *ApoE* tenha sido o responsável pela maior incidência de DA, reforçando deste modo a importância do lítio na preservação do status cognitivo dos pacientes.

LÍTIO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E PROTEOMA

Nesta tese exploramos pela primeira vez o uso de RaSH no exame da expressão gênica em neurônios hipocâmpais tratados com lítio. Dessa forma, identificamos alguns genes potencialmente regulados por lítio mesmo utilizando uma dosagem 10x abaixo da dosagem terapêutica normal.

No total detectamos 88 genes com expressão diferencial sugerida em relação ao controle, incluindo 26 genes codificadores de proteínas relacionadas ao contexto DA ou GSK3/lítio. Quatro genes dessa lista foram mais estudados e avaliados por qPCR. Nesta validação observamos que o tratamento com lítio resultou em um aumento estatisticamente significativo da expressão de *Ntrk-2* em sintonia com os resultados obtidos por RaSH.

Na análise de proteoma observamos que dentre as proteínas detectadas em gel, oito spots se mostraram diferencialmente expressos entre os géis, respectivos a cada tratamento com lítio e controle.

Encontramos um aumento de *Phospholipase A2, membrane associated precursor* (GIIC sPLA2) e *Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 3*, na cultura controle em relação aos tratamentos. Por outro lado o tratamento com lítio eleva a abundância das seguintes proteínas em relação ao controle: *Serum albumin precursor*, *Dihydropyrimidinase-related protein 2* (DRP-2), *Dynein light intermediate chain 2*, *Quinone oxidoreductase*. E interessante nossos achados de proteínas diferencialmente expressas vão de encontro a outros estudos de proteoma de DA, de modelo de lítio-pilocarpina de epilepsia, e de camundongos transgênicos para *Gsk3b* corroborando a sua validade.

REFERÊNCIAS*

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*. 1997 Jul 1;16(13):3797-804.
- Aghdam SY, Barger SW. Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr Alzheimer Res*. 2007 Feb;4(1):21-31.
- Akiyama H, Shin RW, Uchida C, Kitamoto T, Uchida T. Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid beta from beta-cleaved amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 21;336(2):521-9.
- Alonso M, Martinez A. GSK-3 inhibitors: discoveries and developments. *Curr Med Chem*. 2004 Mar;11(6):755-63.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett*. 1999 Jun 25;453(3):260-4.
- Andersson ML, Medstrand P, Yin H, Blomberg J. Differential expression of human endogenous retroviral sequences similar to mouse mammary tumor virus in normal peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Jun 10;12(9):833-40.
- Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci*. 2004;23(3):157-65.
- Atack JR, Prior AM, Griffith D, Ragan CI. Characterization of the effects of lithium on phosphatidylinositol (PI) cycle activity in human muscarinic m1 receptor-transfected CHO cells. *Br J Pharmacol*. 1993 Oct;110(2):809-15.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, et al. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15233-8.
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, et al. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):11074-9.
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7583-90.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
- Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):213-25.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Bosetti F, Seemann R, Bell JM, Zahorchak R, Friedman E, Rapoport SI, et al. Analysis of gene expression with cDNA microarrays in rat brain after 7 and 42 days of oral lithium administration. *Brain Res Bull.* 2002 Jan 15;57(2):205-9.
- Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249 Suppl 3:14-22.
- Braak H, Braak E. Alzheimer's disease: striatal amyloid deposits and neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1990 May;49(3):215-24.
- Braak H, Braak E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging.* 1994 May-Jun;15(3):355-6; discussion 79-80.
- Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, et al. Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Jan 31;110(1):119-25.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 1995 Apr;14(4):879-88.
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 1999 Sep;65(3):664-70.
- Cardinaux JR, Magistretti PJ, Martin JL. Brain-derived neurotrophic factor stimulates phosphorylation of stathmin in cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Nov;51(1-2):220-8.
- Caricasole A, Copani A, Caruso A, Caraci F, Iacovelli L, Sortino MA, et al. The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2003 May;24(5):233-8.
- Carter J, Lippa CF. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med.* 2001 Dec;1(6):733-7.
- Caselli RJ, Beach TG, Yaari R, Reiman EM. Alzheimer's disease a century later. *J Clin Psychiatry.* 2006 Nov;67(11):1784-800.
- Castren E. Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2004 Jun;29(3):289-302.
- Cedazo-Minguez A. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med.* 2007 Nov-Dec;11(6):1227-38.
- Chai CK. The genetics of Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2007 Feb-Mar;22(1):37-41.
- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8745-50.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem.* 2000 Oct;75(4):1729-34.
- Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6039-42.

- Corder EH, Lannfelt L, Bogdanovic N, Fratiglioni L, Mori H. The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Sep;54(9):928-34.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
- Czyzewski K, Pfeffer A, Barcikowska M. [Apolipoprotein E function in the nervous system]. *Neurol Neurochir Pol.* 1998 Jan-Feb;32(1):125-32.
- De Ferrari GV, Inestrosa NC. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Aug;33(1):1-12.
- De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology.* 2002 Dec;43(7):1158-64.
- De Strooper B, Woodgett J. Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature.* 2003 May 22;423(6938):392-3.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):6025-30.
- Dickson TC, Vickers JC. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001;105(1):99-107.
- Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(Pt 7):1175-86.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 1997 Jan 31;275(5300):661-5.
- Eastham HM, Lind RJ, Eastlake JL, Clarke BS, Towner P, Reynolds SE, et al. Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*. *Eur J Neurosci.* 1998 Mar;10(3):879-89.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, et al. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci.* 2003 Aug 13;23(19):7311-6.
- Engelsmann F, Katz J, Ghadirian AM, Schachter D. Lithium and memory: a long-term follow-up study. *J Clin Psychopharmacol.* 1988 Jun;8(3):207-12.
- Fahy S, Lawlor BA. Lithium use in octogenarians. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2001 Oct;16(10):1000-3.
- Farrer MJ, Crayton L, Davies GE, Oliver C, Powell J, Holland AJ, et al. Allelic variability in D21S11, but not in APP or APOE, is associated with cognitive decline in Down syndrome. *Neuroreport.* 1997 May 6;8(7):1645-9.
- Fath T, Eidenmuller J, Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002 Nov 15;22(22):9733-41.

- Findeis MA. The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.* 2007 Nov;116(2):266-86.
- Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 2001 Oct 1;359(Pt 1):1-16.
- Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Dec;47(1-3):275-89.
- Fumoto K, Hoogenraad CC, Kikuchi A. GSK-3beta-regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *Embo J.* 2006 Dec 13;25(24):5670-82.
- Garrido R, Menezes PR. [Impact on caregivers of elderly patients with dementia treated at a psychogeriatric service]. *Rev Saude Publica.* 2004 Dec;38(6):835-41.
- Gould TD, Chen G, Manji HK. In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Jan;29(1):32-8.
- Gould TD, Manji HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res.* 2002 Aug;53(2):687-97.
- Greene ND, Bamidele A, Choy M, de Castro SC, Wait R, Leung KY, et al. Proteome changes associated with hippocampal MRI abnormalities in the lithium pilocarpine-induced model of convulsive status epilepticus. *Proteomics.* 2007 Apr;7(8):1336-44.
- Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001 Nov;65(4):391-426.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960 Feb;23:56-62.
- Haroutunian V, Greig N, Pei XF, Utsuki T, Gluck R, Acevedo LD, et al. Pharmacological modulation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein levels in the CSF of rats with forebrain cholinergic system lesions. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Jun;46(1-2):161-8.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 May;45(2):104-14.
- Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 2002 Dec;43(7):1173-9.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 2003 Aug;60(8):1119-22.
- Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol.* 1997 May 1;185(1):82-91.
- Heinonen O, Lehtovirta M, Soininen H, Helisalmi S, Mannervaa A, Sorvari H, et al. Alzheimer pathology of patients carrying apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Neurobiol Aging.* 1995 Jul-Aug;16(4):505-13.

- Herrera E, Jr., Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002 Apr-Jun;16(2):103-8.
- Hoeflich A, Fetscher O, Lahm H, Blum WF, Kolb HJ, Engelhardt D, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):834-8.
- Hoffmann H, Gremme T, Hatt H, Gottmann K. Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons. *J Neurochem*. 2000 Oct;75(4):1590-9.
- Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 1997 Oct 3;272(40):25326-32.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
- Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, et al. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2005 Jan 3;373(1):1-4.
- Inestrosa N, De Ferrari GV, Garrido JL, Alvarez A, Olivares GH, Barria MI, et al. Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2002 Nov;41(5):341-4.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):198-210.
- Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*. 2007 Jun 1;282(22):16502-10.
- Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12684-9.
- Jin L, Hu X, Feng L. NT3 inhibits FGF2-induced neural progenitor cell proliferation via the PI3K/GSK3 pathway. *J Neurochem*. 2005 Jun;93(5):1251-61.
- Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):95-102.
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res*. 2007 Apr-May;32(4-5):577-95.
- Jope RS. A bimodal model of the mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry*. 1999 Jan;4(1):21-5.
- Kang DE, Soriano S, Frosch MP, Collins T, Naruse S, Sisodia SS, et al. Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the beta-catenin-signaling pathway. *J Neurosci*. 1999 Jun 1;19(11):4229-37.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.

- Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*. 2000 Jun 13;54(11):2072-7.
- Khachaturian AS, Corcoran CD, Mayer LS, Zandi PP, Breitner JC. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 May;61(5):518-24.
- Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci*. 2005 Jan 1;118(Pt 1):89-99.
- Kirschenbaum F, Hsu SC, Cordell B, McCarthy JV. Substitution of a glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation site in presenilin 1 separates presenilin function from beta-catenin signaling. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7366-75.
- Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8455-9.
- Kowall NW. Beta amyloid neurotoxicity and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1994 Mar-Apr;15(2):257-8.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002 Feb;12(1):13-25.
- Kuo YM, Crawford F, Mullan M, Kokjohn TA, Emmerling MR, Weller RO, et al. Elevated A beta and apolipoprotein E in A betaPP transgenic mice and its relationship to amyloid accumulation in Alzheimer's disease. *Mol Med*. 2000 May;6(5):430-9.
- Lambert JC, Amouyel P. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Aug;32 Suppl 1:S62-70.
- Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC. Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3beta promoter. *Genomics*. 1999 Sep 1;60(2):121-8.
- Le WD, Xie WJ, Kong R, Appel SH. Beta-amyloid-induced neurotoxicity of a hybrid septal cell line associated with increased tau phosphorylation and expression of beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 1997 Sep;69(3):978-85.
- Leighton IA, Curmi P, Campbell DG, Cohen P, Sobel A. The phosphorylation of stathmin by MAP kinase. *Mol Cell Biochem*. 1993 Nov;127-128:151-6.
- Lemaire V, Aourousseau C, Le Moal M, Abrous DN. Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 1999 Nov;11(11):4006-14.
- Leroy K, Brion JP. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat*. 1999 Jun;16(4):279-93.
- Levesque G, Yu G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L, Yu H, et al. Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and beta-catenin. *J Neurochem*. 1999 Mar;72(3):999-1008.
- Li X, Lu F, Tian Q, Yang Y, Wang Q, Wang JZ. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm*. 2006 Jan;113(1):93-102.
- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci*. 2003 Mar 1;23(5):1605-11.

- Lopes MA, Bottino CM. [Prevalence of dementia in several regions of the world: analysis of epidemiologic studies from 1994 to 2000]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002 Mar;60(1):61-9.
- Lovestone S, Howard R. Alzheimer's disease: a treatment in sight? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 Dec;59(6):566-7.
- Lovestone S. Early diagnosis and the clinical genetics of Alzheimer's disease. *J Neurol*. 1999 Feb;246(2):69-72.
- Lu R, Song L, Jope RS. Lithium attenuates p53 levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroreport*. 1999 Apr 6;10(5):1123-5.
- Lucas FR, Salinas PC. WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol*. 1997 Dec 1;192(1):31-44.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J*. 2001 Jan 15;20(1-2):27-39.
- Luchsinger JA, Mayeux R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2004 Jul;6(4):261-6.
- Magrane J, Rosen KM, Smith RC, Walsh K, Gouras GK, Querfurth HW. Intraneuronal beta-amyloid expression downregulates the Akt survival pathway and blunts the stress response. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10960-9.
- Makalowski W, Boguski MS. Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9407-12.
- Manji HK, Moore GJ, Chen G. Bipolar disorder: leads from the molecular and cellular mechanisms of action of mood stabilizers. *Br J Psychiatry Suppl*. 2001 Jun;41:s107-19.
- Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 9:82-96.
- Manji HK, Potter WZ, Lenox RH. Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Jul;52(7):531-43.
- Marklund U, Brattsand G, Osterman O, Ohlsson PI, Gullberg M. Multiple signal transduction pathways induce phosphorylation of serines 16, 25, and 38 of oncoprotein 18 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1993 Dec 5;268(34):25671-80.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, et al. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*. 2003 Nov 11;61(9):1185-90.
- Mayeux R. Apolipoprotein E, Alzheimer disease, and African Americans. *Arch Neurol*. 2003 Feb;60(2):161-3.
- Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:81-104.
- McAllister AK. Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13600-2.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*. 2005 Jul 21;47(2):191-9.

- Mensenkamp AR, Jong MC, van Goor H, van Luyn MJ, Bloks V, Havinga R, et al. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem*. 1999 Dec 10;274(50):35711-8.
- Miyaoka T, Seno H, Ishino H. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res*. 1999 Jul 27;38(1):1-6.
- Moore GJ, Bebchuk JM, Hasanat K, Chen G, Seraji-Bozorgzad N, Wilds IB, et al. Lithium increases N-acetyl-aspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? *Biol Psychiatry*. 2000 Jul 1;48(1):1-8.
- Moore GJ, Bebchuk JM, Wilds IB, Chen G, Manji HK. Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet*. 2000 Oct 7;356(9237):1241-2.
- Mortimer AM, Martin M, Wheeler Vega JA, Tyson PJ. Conventional antipsychotic prescription in unipolar depression, II: withdrawing conventional antipsychotics in unipolar, nonpsychotic patients. *J Clin Psychiatry*. 2003 Jun;64(6):668-72; quiz 738-9.
- Mortimer JA, Borenstein AR. Tools of the epidemiologist. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Jul-Sep;20(3 Suppl 2):S35-41.
- Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci*. 2002 Jan;25(1):22-6.
- Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*. 1996 Aug;16(8):4088-94.
- Munoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett*. 1997 Jul 14;411(2-3):183-8.
- Murai H, Okazaki M, Kikuchi A. Tyrosine dephosphorylation of glycogen synthase kinase-3 is involved in its extracellular signal-dependent inactivation. *FEBS Lett*. 1996 Aug 26;392(2):153-60.
- Nemeth H, Varga H, Farkas T, Kis Z, Vecsei L, Horvath S, et al. Long-term effects of neonatal MK-801 treatment on spatial learning and cortical plasticity in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Feb;160(1):1-8.
- Nitrini R, Caramelli P, Herrera E, Jr., Bahia VS, Caixeta LF, Radanovic M, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004 Oct-Dec;18(4):241-6.
- Nitrini R, Caramelli P, Herrera E, Jr., de Castro I, Bahia VS, Anghinah R, et al. Mortality from dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2005 Mar;20(3):247-53.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 10;102(19):6990-5.
- Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2642-7.
- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2007 Apr;190:359-60.

- Nusse R, Samos CH, Brink M, Willert K, Cadigan KM, Wodarz A, et al. Cell culture and whole animal approaches to understanding signaling by Wnt proteins in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1997;62:185-90.
- Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell*. 1992 Jun 26;69(7):1073-87.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*. 1997 Oct 3;272(40):24735-8.
- Pachet AK, Wisniewski AM. The effects of lithium on cognition: an updated review. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Nov;170(3):225-34.
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):837-46.
- Parr BA, McMahon AP. Wnt genes and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 1994 Aug;4(4):523-8.
- Patapoutian A, Reichardt LF. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Jun;10(3):392-9.
- Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Jun;11(3):272-80.
- Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science*. 2000 Mar 3;287(5458):1606-9.
- Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Haines JL, Garcia ME, Oksenberg JR, et al. Linkage and association analysis of chromosome 19q13 in multiple sclerosis. *Neurogenetics*. 2001 Oct;3(4):195-201.
- Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:789-813.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):435-9.
- Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW. Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem*. 1997 Oct;69(4):1601-11.
- Polakis P. More than one way to skin a catenin. *Cell*. 2001 Jun 1;105(5):563-6.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci*. 2003 Apr;6(4):345-51.
- Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 2001 Jan 19;412(1):1-12.
- Roh MS, Eom TY, Zmijewska AA, De Sarno P, Roth KA, Joje RS. Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. *Biol Psychiatry*. 2005 Feb 1;57(3):278-86.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):24-6.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*. 1997 Oct 15;57(20):4624-30.

- Rubinfeld B, Tice DA, Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):39037-45.
- Sandbrink R, Monning U, Masters CL, Beyreuther K. Expression of the APP gene family in brain cells, brain development and aging. *Gerontology*. 1997;43(1-2):119-31.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993 Aug;43(8):1467-72.
- Scazufca M, Cerqueira AT, Menezes PR, Prince M, Vallada HP, Miyazaki MC, et al. [Epidemiological research on dementia in developing countries]. *Rev Saude Publica*. 2002 Dec;36(6):773-8.
- Scheff SW, Sparks L, Price DA. Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1993 Sep;34(3):356-61.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649-53.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66.
- Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*. 2001 Oct 25;32(2):177-80.
- Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Wattez A, Delacourte A. Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett*. 1997 Aug 4;412(3):578-82.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5522-7.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1217-81.
- Sproule BA, Hardy BG, Shulman KI. Differential pharmacokinetics of lithium in elderly patients. *Drugs Aging*. 2000 Mar;16(3):165-77.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 1996 Dec 1;6(12):1664-8.
- Su JL, Fornwald J, Rivers P, Goldsworthy S, Looney NA, Hanvey J, et al. A cell-based time-resolved fluorescence assay for selection of antibody reagents for G protein-coupled receptor immunohistochemistry. *J Immunol Methods*. 2004 Aug;291(1-2):123-35.
- Sultana R, Boyd-Kimball D, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, et al. Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome. *J Alzheimers Dis*. 2007 May;11(2):153-64.

- Sultana R, Newman S, Mohammad-Abdul H, Keller JN, Butterfield DA. Protective effect of the xanthate, D609, on Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in primary neuronal cells. *Free Radic Res.* 2004 May;38(5):449-58.
- Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, et al. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Jama.* 2003 Apr 23-30;289(16):2094-103.
- Takada LT, Caramelli P, Radanovic M, Anghinah R, Hartmann AP, Guariglia CC, et al. Prevalence of potentially reversible dementias in a dementia outpatient clinic of a tertiary university-affiliated hospital in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003 Dec;61(4):925-9.
- Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, et al. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 1998 Aug;31(4):317-23.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, et al. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett.* 1996 Jan 12;203(1):33-6.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 15;90(16):7789-93.
- Takashima A, Yamaguchi H, Noguchi K, Michel G, Ishiguro K, Sato K, et al. Amyloid beta peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1995 Sep 29;198(2):83-6.
- Tatebayashi Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Dynamic regulation of expression and phosphorylation of tau by fibroblast growth factor-2 in neural progenitor cells from adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 1999 Jul 1;19(13):5245-54.
- Tesco G, Tanzi RE. GSK3 beta forms a tetrameric complex with endogenous PS1-CTF/NTF and beta-catenin. Effects of the D257/D385A and FAD-linked mutations. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:227-32.
- Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V, Corsmit E, et al. Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 2006 Jun;78(6):936-46.
- Van Broeck B, Vanhoutte G, Pirici D, Van Dam D, Wils H, Cuijt I, et al. Intraneuronal amyloid beta and reduced brain volume in a novel APP T714I mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2008 Feb;29(2):241-52.
- van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A, Van Broeckhoven C. Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet.* 1991 Apr 20;337(8747):978.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.
- Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A. Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J Neurochem.* 2005 Jan;92(2):294-301.

- Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D. beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 31;392(3):117-23.
- Wilkins JF, Bitensky MW, Willardson BM. Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods. *J Biol Chem.* 1996 Aug 9;271(32):19232-7.
- Wilkins MR, Lindskog I, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Hochstrasser DF, et al. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis.* 1997 Mar-Apr;18(3-4):403-8.
- Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, et al. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4916-22.
- Wolfe MS, De Los Angeles J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1999 Aug 31;38(35):11223-30.
- Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's disease. *Semin Neurol.* 2007 Feb;27(1):32-41.
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 1996 Jun 15;10(12):1443-54.
- Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 1978 Nov;133:429-35.
- Younkin SG. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris.* 1998 Jun-Aug;92(3-4):289-92.
- Yu G, Chen F, Levesque G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L, et al. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26;273(26):16470-5.
- Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem.* 2001 Aug 24;276(34):31674-83.
- Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol.* 2002 Feb 4;156(3):519-29.
- Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, et al. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature.* 1998 Oct 15;395(6703):698-702.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, et al. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* 1995 May 19;81(4):525-31.

ANEXO A

Capítulo de livro: Perspectivas do Estudo do Genoma Humano para Psiquiatria e a Psicofarmacologia

Sheila Passos Gregorio, **Camila Teixeira Mendes**, Elida Paula Benquique Ojopi, Emmanuel Dias Neto. Perspectivas do Estudo do Genoma Humano para Psiquiatria e a Psicofarmacologia. In: Manual de Psicofarmacologia Clínica. Brasil: Guanabara Koogan Edt.; 2006, 2ª.ed. p.118-126.

Perspectivas do estudo do Genoma Humano para a Psiquiatria e Psicofarmacologia

Sheila Passos Gregório^{1,2}, Camila Teixeira Mendes^{1,3}, Elida PB Ojopi¹ e
Emmanuel Dias Neto¹

1 – Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria;
Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
R. Dr. Ovídio de Campos, s/n - Consolação
05403-010, São Paulo, SP BRASIL
Telefone 00 55 11 3069.7267, 3069.7283
FAX 00 55 11 3062.4851

2 – Pós-graduação em Bioquímica
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

3 – Pós-graduação em Biotecnologia (Interunidades)
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Projeto Genoma Humano

No dia 26 de Junho de 2000, a empresa *Celera Genomics* e Consórcio Internacional de Seqüenciamento do Genoma Humano (HGSC) fizeram um anúncio, em conjunto, na Casa Branca: o genoma humano havia sido seqüenciado. Após este anúncio, o ano seguinte assistiu à publicação da análise dos dados (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001), em artigos que mereceram fascículos especiais de duas das principais revistas científicas mundiais (*Nature* e *Science*), e que estão entre os mais importantes trabalhos científicos já publicados em todos os tempos. A disponibilidade desta versão preliminar, o primeiro rascunho do genoma humano com cerca de 90% de precisão, significava a disponibilização da “planta baixa” do nosso genoma, uma avançada plataforma para pesquisas. O seqüenciamento do genoma humano representou um dos mais importantes marcos da história científica moderna, com um impacto imenso e direto sobre a maneira pela qual iremos pensar e estudar a medicina nos próximos anos.

Aristides Patrinos, o diretor do projeto genoma humano do lado do Departamento de Energia dos Estados Unidos (um dos financiadores do projeto), comentou que “o seqüenciamento do genoma humano foi uma aventura pioneira cheia de riscos e incertezas. Mas o projeto criou uma revolução, transformando as ciências biológicas de uma maneira além do que podemos imaginar. Nós abrimos as portas de um novo e vasto cenário biológico. Para explorá-lo vamos precisar de uma criatividade ainda maior, além de novas gerações de tecnologia”. Em uma publicação seguinte, que pode ser considerada como um dos marcos do término do seqüenciamento do genoma humano, Francis Collins conclui dizendo que “O término do seqüenciamento de nosso genoma não deve ser visto como um fim. Ele marca o início de uma nova era, a era da genômica na medicina e na saúde. Nós acreditamos firmemente que o melhor ainda está por vir, e encorajamos as pessoas e os cientistas ao redor do mundo a se unirem a nós, para que transformemos esta visão em realidade” (Collins et al., 2003).

O entusiasmo gerado por este projeto não é injustificado. Sabemos que as informações genômicas irão alterar diversos aspectos da prática clínica. A maior informação sobre nosso genoma irá melhorar de forma substancial a nossa compreensão dos mecanismos de doenças, e servirá como um guia para o desenvolvimento de novas drogas e procedimentos clínicos, fornecendo subsídios inestimáveis para a compreensão e predição de resposta terapêutica. Em curto prazo, podemos esperar um grande impacto sobre nossa capacidade diagnóstica, que deverá ser feito de modo mais preciso e muito mais informativo, incluindo aspectos relacionados ao tipo de doença, endofenótipos, forma e velocidade de progressão e abordagem terapêutica mais recomendada. Deste modo, poderemos ter uma medicina mais fortemente orientada para um caráter preventivo, ao invés de estar colocando seus esforços mais preciosos no tratamento das doenças já em seus estágios finais.

O tamanho e o número de genes do nosso genoma

O tamanho total do genoma humano foi estimado em cerca de 3 bilhões de nucleotídeos. O tamanho estimado para os cromossomos autossômicos humanos varia de 221,6 milhões (cromossomo 2) até 33,8 milhões de bases (cromossomo 22). Dentre os cromossomos sexuais, o cromossomo X é seis vezes maior que o Y, que possui apenas 21,8 milhões de bases.

Apesar de todos os esforços dos grupos envolvidos no Projeto Genoma Humano, ainda não podemos determinar com clareza qual é o número exato de genes que possuímos. A complexidade de nosso genoma excede a maioria dos genomas já seqüenciados, e requer o uso de diversas abordagens para responder a esta questão. As estimativas atuais estão ao redor de 26 a 39 mil genes envolvidos com a síntese de proteínas. No entanto, diversas outras regiões do genoma são transcritas e têm sido associadas com a regulação dos mecanismos de transcrição (síntese de RNA a partir de um molde de DNA), tais como os RNAs não-codificadores e os micro-RNAs e certamente devem também ser contabilizados como genes em nosso genoma.

Cabe notar que mesmo após termos identificado uma região genômica como contendo um gene, ainda temos que determinar a sua função biológica. A função de um significativo percentual de nossos genes (cerca de 40%) ainda não é conhecida. Além disto, a maioria dos nossos genes parece sofrer formas alternativas de processamento, o que contribui de modo dramático para uma imensa variedade no conjunto de proteínas que podem ser produzidas a partir do universo de genes contidos em nosso DNA. Todos estes processos certamente contribuem para nosso desenvolvimento e para nossas atividades biológicas, e precisam ser compreendidos no contexto de nossa saúde e de nossas doenças.

A diversidade genética humana

Um dos mais relevantes achados oriundos do seqüenciamento de nosso DNA, foi a descoberta da extensão de nossa diversidade genética. Após inúmeros estudos, sabemos hoje que existe uma variação de cerca de 0,1% entre a seqüência DNA de quaisquer dois indivíduos (com exceção para os gêmeos monozigóticos). Deste modo, quando uma mesma região do DNA é comparada entre dois indivíduos e nucleotídeos diferentes são encontrados em uma dada posição, dizemos que existe um Polimorfismo de Nucleotídeo Único, ou SNP (do inglês - *Single Nucleotide Polymorphism*). Um fator que reveste os SNPs de grande importância é a sua abundância. Estima-se que na comparação de seqüências de DNA de dois indivíduos não relacionados, seja identificado um SNP a cada 1 ou 2 mil nucleotídeos. Isto significa que na comparação entre estes dois genomas, teríamos de 1,6 a 3,2 milhões de SNPs. Atualmente (março de 2005), encontramos no principal banco de dados de polimorfismos humanos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi) um total de 3,7 milhões de polimorfismos de DNA não-redundantes, já validados e que se encontram disponíveis para qualquer tipo de estudo. Acredita-se que pelo menos 60 mil destes SNPs se localizem dentro de genes humanos, com boa probabilidade de estarem associados a características importantes. No entanto, a imensa maioria destes SNPs ainda não foi estudada no DNA de indivíduos ou de populações, e

diversos destes devem estar associados questões clinicamente relevantes.

A maior parte dos SNPs não resulta em alterações na sequência protéica, graças à sua localização em regiões não traduzidas da molécula de mRNA ou devido à degeneração dos códons (quando o mesmo aminoácido de uma proteína é codificado por diferentes códons). Assim, apenas uma pequena parcela dos SNPs tem a capacidade de alterar a sequência das proteínas, o que por sua vez poderia levar à modificação da sua atividade biológica. São estes polimorfismos, os chamados “SNPs não-sinônimos”, os que têm maior potencial de reflexo fisiológico. Além desta categoria de SNP, podemos encontrar efeitos fisiológicos importantes entre aqueles SNPs que estão localizados em regiões promotoras dos genes, além de regiões envolvidas com a regulação da transcrição, dos eventos de *splicing*, ou com a regulação da estabilidade dos mRNAs.

A capacidade de identificar polimorfismos e associá-los a diferentes graus de susceptibilidade ou evolução das doenças humanas pode representar um dos maiores progressos da pesquisa biológica nos próximos anos. Uma das maiores promessas destas análises é a possibilidade de uso de ferramentas de genética molecular na determinação de susceptibilidade ao desenvolvimento de uma grande variedade de doenças humanas ou a pré-determinação de resposta a diversas drogas. A aplicação deste potencial terá implicações diretas e de grande importância na análise de predisposição genética às doenças e também para os estudos de farmacogenômica. Trabalhos desta natureza, feitos com amostras de DNA associadas a bancos de dados complexos e ricos em amostras, analisados com abordagem estatística adequada, prometem revelar marcadores moleculares relevantes em relação à evolução clínica de várias doenças, assim como a predição de resposta a diferentes tratamentos, tudo baseado em nossa individualidade genética, permitindo contemplar a tão desejada medicina genômica personalizada.

Um grande valor do estudo dos SNPs reside na capacidade de estudarmos estas alterações de DNA em uma grande variedade de amostras biológicas. Como o DNA das células de nosso corpo é o mesmo, independente da origem das células, o estudo dos SNPs possibilita que análises importantes sejam feitas em

amostras biológicas diversas, e não necessariamente no tecido doente. Tal característica reveste os SNPs de grande importância, de modo especial para o estudo das doenças neuropsiquiátricas, onde amostras cerebrais afetadas são obtidas apenas em ocasiões extremamente especiais. Na maioria dos casos, os SNPs são algumas das poucas ferramentas de estudo disponíveis, devido à dificuldade de obtenção de amostras cerebrais adequadamente preservadas para outros estudos.

O uso da genômica no estudo de doenças neuropsiquiátricas

Acredita-se que 99% de toda a pesquisa genética de doenças neuropsiquiátricas feita até hoje tenha se concentrado em apenas cerca de 1% dos genes humanos. No entanto, sabemos que ao menos 55% dos genes que possuímos são expressos no cérebro, o que demonstra de maneira inequívoca, que a pesquisa genética em neuropsiquiatria está apenas nos seus momentos iniciais. Uma imensa população de genes ainda deve ser estudada para que possamos avançar nos conhecimentos nesta importante área. As plataformas de microarranjos de DNA (*DNA microarrays*), seqüenciamento de DNA e genotipagem de SNPs, além de análises de expressão gênica em larga escala (todas estas já disponíveis no Brasil) devem permitir um importante avanço desta área nos próximos anos.

Os estudos feitos até hoje, nas doenças neuropsiquiátricas, serviram como uma base fundamental para avançarmos nos estudos de genética. Sabemos hoje, por exemplo, que mutações diferentes, em diferentes genes, podem vir a causar a mesma doença, como é o caso das mutações em APP, presenilina 1 ou presenilina 2 na doença de Alzheimer de origem familiar. Sabemos ainda que a penetrância, ou a capacidade de uma mutação associada a um evento funcional ser ativa em todos os indivíduos é extremamente variável, e de acordo com características genéticas e ambientais, a existência de uma alteração pode ter efeitos diversos sobre o desenvolvimento de uma doença. Nesta mesma linha, sabemos que podemos esperar muito dos estudos genéticos, no entanto, a

literatura está repleta de casos onde o gene responsável por uma doença foi identificado, com diretas aplicações diagnósticas, mas infelizmente ainda sem reflexos em um melhor tratamento ou maior sobrevida dos afetados.

As doenças complexas certamente devem ter como base um conjunto de alterações de “pequeno efeito”, que ocorrem simultaneamente em um certo conjunto de genes. Em doenças neuropsiquiátricas, buscamos fatores múltiplos que contribuam cumulativamente, aumentando a susceptibilidade a uma doença. Deste modo, o estudo destas doenças requer a análise simultânea, para um mesmo universo de pacientes, de um grande número de alterações genéticas. Aliado a isto, os estudos devem contemplar um grande N amostral (que permita a adoção de testes significativos adequados para o estudo de genes de pequenos efeitos), além de indivíduos de etnias diversas, entre casos e controles, de modo a encontrarmos alterações relacionadas à doença, que sobrevivam a análises feitas com a diversidade genética de nossa espécie.

Os estudos de associação em doenças neuropsiquiátricas são marcados por resultados pouco estimulantes. A maioria dos estudos é feita com poucos, e geralmente com os mesmos genes, contemplando um N amostral pequeno e com amostras mal pareadas em termos étnicos, etários e socioeconômicos. Aliado a isto é comum que grupos não sejam capazes de replicar associações previamente descritas, por vezes, na mesma população. Este quadro pode levar a uma situação de descrença na busca de genes candidatos para estas doenças. Apesar disto, as evidências de herdabilidade nas doenças neuropsiquiátricas são inquestionáveis, e não temos dúvidas de que os genes que conferem maior susceptibilidade serão apontados no futuro.

A diversidade genética e a farmacologia: farmacogenômica

A melhoria da eficácia terapêutica e a redução dos efeitos adversos e toxicidade são dois dos maiores objetivos dos estudos genéticos na prática clínica. Estes objetivos podem ser alcançados pela identificação de alvos mais adequados para certas doenças, e também pela identificação prévia dos pacientes

considerados “bons-respondedores” a certos fármacos. Deve estar claro que, para exercerem sua atividade farmacológica, em geral, as drogas interagem com alvos protéicos específicos. Estes alvos podem ser receptores, enzimas, proteínas envolvidas com vias metabólicas específicas e outros. Como discutido anteriormente, estes alvos de drogas podem apresentar polimorfismos que afetem esta capacidade de ligação, ou que respondam de modo distinto à presença da droga, alterando a especificidade e a efetividade da medicação.

A definição de alvos terapêuticos é um objetivo de estudos extensos, com diversificadas técnicas de pesquisa. De modo geral, estes alvos consistem em produtos celulares que diferenciem os tecidos doentes dos saudáveis. Moléculas características de tecidos doentes podem ser usadas como um alvo de drogas ou ligantes específicos, ou pode ser feita uma intervenção dirigida em suas vias de síntese, de modo a modular farmacologicamente este processo. Por vezes, estas moléculas podem reduzir ou até mesmo eliminar uma dada via metabólica, e ao conhecermos este processo, podemos intervir nesta via, buscando recompor sua atividade funcional original. Paralelamente, a descoberta de moléculas ou vias metabólicas características de tecidos saudáveis, permite a busca da síntese destes elementos em laboratório, e a sua re-introdução ou re-ativação de sua produção nos tecidos doentes.

A literatura já está repleta de casos onde variações genéticas se demonstraram valiosas na prática clínica. Alguns exemplos são as variantes dos genes codificadores do citocromo P450, acetil-transferases, tiopurina metiltransferase ou dihidropirimidina desidrogenase, que permitiram definir grupos de indivíduos capazes de metabolizar distintas drogas com diferente eficácia, trazendo conseqüentemente uma maior segurança e maior eficácia no tratamento. A disponibilidade de ferramentas de análise genômica em larga escala com o estudo simultâneo de milhares de variações de DNA, permitirá grandes avanços no estudo de variações de resposta e de toxicidade para diversas drogas.

Cabe notar que em dezembro de 2004, o *FDA* norte-americano aprovou pela primeira vez a realização de testes para determinar, de acordo com o perfil genético, os pacientes respondedores certas drogas. Este teste é feito em um *chip*

de DNA que contém as variações de um dos genes codificadores do citocromo P450, enzimas que participam da metabolização de diversas drogas no fígado. O teste aprovado permite avaliar rapidamente, qual a forma apresentada por um indivíduo, para o gene codificador da enzima CYP2D6, que está envolvida no metabolismo de beta-bloquadores, quimioterápicos usados no tratamento do câncer, anti-depressivos e antipsicóticos. Estes testes permitirão determinar, em conjunto com dados clínicos e avaliações do histórico médico, quais as medicações e qual a dosagem mais recomendada, de acordo com as características genéticas do indivíduo avaliado.

A seguir, apresentaremos uma síntese dos principais achados em farmacogenômica da esquizofrenia, da epilepsia e da doença de Alzheimer.

FARMACOGÊNOMICA E ESQUIZOFRENIA

Os antipsicóticos usados no tratamento da esquizofrenia se tornaram clinicamente disponíveis por volta de 1950. Os primeiros antipsicóticos disponíveis tais como a Clorpromazina, produziram uma melhora significativa nos sintomas positivos da esquizofrenia, mas não resultaram em maiores benefícios sobre os sintomas negativos. Esses primeiros antipsicóticos agem sobre uma série de receptores de neurotransmissores, tais como os receptores adrenérgicos, muscarínicos, histamínicos e serotoninérgicos. Essa ampla ação sobre diversos receptores demonstra a grande inespecificidade de sua atividade, o que ocasiona a ocorrência de efeitos colaterais importantes, como sedação e hipotensão, além de efeitos extrapiramidais, tais como distonias agudas e parkinsonismo que também ocorrem com grande frequência.

A partir da década de 70 começaram a surgir os novos antipsicóticos, denominados “atípicos”, caracterizados por reduzirem drasticamente a propensão ao desenvolvimento de sintomas extrapiramidais, principalmente por agirem com uma maior especificidade, sobre os receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos. O primeiro deles, a Clozapina, é muito efetivo no tratamento de pacientes resistentes a outros tratamentos, e resulta em melhora significativa dos sintomas

negativos. Entretanto, possui efeitos colaterais, tais como hipersalivação, sedação, e maior risco para desenvolvimento de agranulocitose e convulsões. Outros antipsicóticos atípicos têm sido desenvolvidos, tais como Risperidona, Olanzapina, Quetiapina, Ziprazidona e Aripiprazol. Efeitos colaterais também são comuns com a administração desses medicamentos, apesar de suas intensidades variarem muito. São comuns o ganho de peso, hiperlipidemia, alteração do metabolismo da glicose e desenvolvimento de resistência à insulina, podendo resultar em diabetes mellitus tipo 2, característicos principalmente da Olanzapina e da Clozapina.

Apesar de um certo grau de eficácia e propensão ao desenvolvimento de sintomas colaterais e extrapiramidais serem atribuídos a cada um dos antipsicóticos disponíveis, sabe-se que há diferenças marcantes na resposta interindividual dos pacientes aos diferentes medicamentos. Ainda não há um meio eficaz de prever qual será a resposta do paciente à determinada dose de um medicamento, nem o tempo necessário para observar-se os efeitos da droga, sendo que devem ser feitos um acompanhamento constante e testes empíricos para se determinar o melhor antipsicótico e a dose adequada para maximizar a resposta e minimizar a toxicidade. Além disto, ainda não é possível prever a ocorrência nem a intensidade de eventuais efeitos colaterais que possam ser desencadeados com as diferentes drogas. Neste ponto, os estudos de farmacogenômica da esquizofrenia são bastante promissores.

A eficácia e os efeitos colaterais dos antipsicóticos aparentam estarem sujeitos a uma regulação poligênica, podendo os aspectos genéticos de cada indivíduo determinar uma resposta individual ao medicamento. Com o advento do seqüenciamento completo do genoma humano, e o desenvolvimento de técnicas rápidas e eficazes para a análise de polimorfismos genéticos (genotipagem), muitas pesquisas têm procurado desvendar quais são os biomarcadores de resposta a antipsicóticos.

Os achados mais relevantes e consistentes até o momento serão descritos a seguir.

CYP 450

A grande maioria das drogas que agem sobre o sistema nervoso central (SNC) são extensivamente metabolizadas por enzimas do citocromo P450 (CYP). Dentre essas enzimas CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4 e CYP2D6 estão relacionadas ao metabolismo de drogas usadas em psiquiatria. Muitos dos genes que codificam essas enzimas possuem polimorfismos genéticos, e de acordo com a variante presente em um indivíduo, ele pode ser classificado como bom-metabolizador (BM) ou um mal-metabolizador (MM). Em geral os indivíduos MM acumulam grandes quantidades da droga, que quando é efetiva, resulta em excelente resposta terapêutica, mas com alta toxicidade. Por outro lado, os metabolizadores rápidos toleram bem o medicamento, mas em geral este apresenta baixa eficiência.

A enzima CYP2D6, para a qual foi desenvolvido o teste recentemente aprovado pelo *FDA* (como relatado anteriormente neste capítulo), têm sido mais extensivamente estudada e as variantes encontradas geram MM, por resultarem em uma atividade diminuída ou até ausente da enzima. Geralmente, os MM apresentam concentrações plasmáticas mais altas das drogas, que tendem a resultar em uma maior presença ou severidade dos efeitos colaterais (Dahl e Bertilsson, 1993). Acredita-se que a CYP2D6 seja responsável pelo metabolismo de cerca de 25% das drogas atualmente comercializadas. Essa enzima contribui para a biodisponibilidade de pelo menos 50 agentes psicotrópicos, incluindo antipsicóticos atípicos e típicos. Aproximadamente 7% dos indivíduos caucasianos e 1% dos asiáticos são MM de substratos da CYP2D6. Deve-se notar que a atividade dessa enzima pode variar em até mil vezes devido a 70 ou mais variações genéticas no seu gene codificador (revisto em Bertilsson et al., 2002). Enquanto que MM têm maior risco de toxicidade durante o tratamento com doses-padrão de antipsicóticos, indivíduos com metabolismo excessivo, causado por alterações genéticas ou duplicações gênicas, podem resultar em exposição sub-terapêutica à droga, e serem erroneamente classificados com resistentes ao tratamento. A enzima CYP2D6 é expressa tanto no fígado quanto no cérebro, e uma varredura genética da mesma poderá não apenas estimar a disposição de antipsicóticos no plasma, mas também no seu sítio de ação específico.

Diversos estudos envolvendo polimorfismos em CYP2D6, mostram que variantes dessa enzima afetam os níveis plasmáticos de Haloperidol. Alguns estudos procuraram correlacionar esses polimorfismos com os níveis de Risperidona e, apesar de ainda haverem poucos estudos e os resultados serem contraditórios, CYP2D6 aparenta estar correlacionado com esse parâmetro. A Discinesia Tardia (DT), efeito extrapiramidal freqüentemente resultante da administração de antipsicóticos típicos, costuma ocorrer em 20-30% dos pacientes e é potencialmente irreversível. Muitos estudos têm procurado evidenciar correlações entre polimorfismos em CYP2D6 e DT e muitos deles encontraram alguma correlação entre polimorfismos que resultam em MM com maior severidade de DT.

A enzima CYP1A2 tem sido analisada principalmente com relação à resposta à Clozapina, tendo sido encontrada uma importante correlação entre a alteração -164C>A no intron 1 (CYP1A2*1F), que resulta em atividade exarcebada da enzima, com piora na resposta à Clozapina.

RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Os antipsicóticos atípicos são antagonistas de dopamina e serotonina por bloquearem os receptores desses neurotransmissores. Várias evidências têm indicado que variações nos genes que codificam esses receptores podem explicar uma notável porcentagem da variabilidade interindividual à resposta a certos antipsicóticos atípicos.

Estudos de associação genética com DT têm focado genes do sistema dopaminérgico, e os achados mais consistentes envolvem o receptor de dopamina D3. O mRNA do gene DRD3, que codifica para esse receptor, têm sido localizado nos gânglios basais, os quais estão implicados no controle motor. Foi identificado uma variante nesse gene que resulta na troca de um aminoácido serina por uma glicina (SER9GLY) no domínio extracelular do receptor D3. Estudos funcionais demonstraram que homozigotos GLY/GLY possuem maior afinidade pela dopamina (Lundstrom e Turpin, 1996), e apresentam metabolismo aumentado de fluoro-2-desoxi-D-glicose (FDG), no núcleo caudato e no putamen, após o

tratamento com haloperidol. Essas regiões cerebrais estão implicadas no controle motor. Diversos estudos têm encontrado correlação entre indivíduos GLY/GLY com um risco elevado para o desenvolvimento de DT. Esse mesmo polimorfismo aparenta estar relacionado com a resposta terapêutica frente a antipsicóticos típicos, apesar de haverem resultados contraditórios com relação ao alelo que resulta na melhor resposta.

Estudos envolvendo polimorfismos no gene DRD2 indicam que variantes neste receptor devem modular a resposta à risperidona e à clorpromazina. No entanto, estudos procurando associar esse receptor com DT não encontraram associação significativa.

RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

A Clozapina aparenta ser o antipsicótico que, como efeito colateral, resulta em maior ganho de peso (Allison et al., 1999), podendo alguns pacientes engordar 50kg ou mais durante um ano de tratamento. Entretanto, nem todos os pacientes engordam, e seria fundamental distinguir os que apresentariam este efeito, antes do início do tratamento. A possibilidade de indicar pacientes que se beneficiariam pelo uso da droga, e estariam livres deste efeito colateral é tema de grande interesse por parte da indústria farmacêutica. A Clozapina é um antagonista do receptor 5-HT_{2C} e agonista do receptor 5-HT_{1A} e existem estudos mostrando que antagonistas de 5-HT_{2C}, bem como agonistas de 5-HT_{1A} causam aumento marcante do apetite (Yamada et al., 1996). Além disso, esses receptores estão localizados em abundância no hipotálamo, um conhecido centro de controle de saciedade (Pazos et al., 1987). Todos os outros antipsicóticos que podem resultar em ganho de peso também agem sobre esses dois receptores, reforçando o possível envolvimento dos mesmos nesse fenótipo. Diversos estudos têm priorizado o estudo de variações nesses receptores, e há evidências de associação entre o polimorfismo -759C/T (alelo C) no promotor do receptor 5-HT_{2C} e ganho de peso durante tratamento com Clozapina, apesar de haver alguns resultados contraditórios. Apesar disto, dois estudos com alto poder estatístico

demonstraram o papel do polimorfismo HIS452TYR no receptor 5-HT_{2A} em prever a resposta à Clozapina.

PERSPECTIVAS

Apesar de ter havido progressos na pesquisa em farmacogenética de esquizofrenia, a abordagem que tem sido utilizada foca apenas alguns poucos genes candidatos, selecionados por suas funções relacionadas ao metabolismo e ação dos antipsicóticos utilizados. Entretanto, abordagens mais amplas de farmacogenômica, que procuram analisar o genoma em larga escala, poderão gerar novos resultados e identificar novas variantes importantes.

Trabalhos mais atuais têm buscado utilizar tecnologias para genotipagem de variações de DNA em larga escala, como por exemplo, os arranjos ou *chips* que já permitem a genotipagem simultânea de até 100.000 SNPs. Esta abordagem apesar de seu alto custo tem sido utilizada com frequência em estudos financiados pela indústria farmacêutica. Os resultados destas análises devem surgir em breve e permitirão uma terapia mais eficaz e mais segura.

Farmacogenética e Epilepsia

Na epilepsia, existe uma grande heterogeneidade na resposta clínica dos pacientes frente à medicação, tanto no que se refere à eficácia quanto aos efeitos adversos. As causas desta variabilidade de resposta são diversas e incluem os mecanismos diversos de patogênese, a severidade da doença, idade, *status* nutricional, função hepática e renal, uso de outras drogas e presença de outras doenças concomitantes. No entanto, acredita-se que as diferenças genéticas devam ser as maiores determinantes da variabilidade observada.

Apesar da entrada no mercado, nos últimos 10 anos, de novas drogas antiepilépticas tais como felbamato, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, tiagabina, topiramato, e zonisamida. Um grande número de pacientes ainda é portador de uma epilepsia farmacoresistente. De fato, para

cerca de um terço dos pacientes com epilepsia, as drogas antiepilépticas disponíveis ainda são ineficientes (Löscher e Schmidt, 2002). No entanto, as causas e mecanismos responsáveis por essa resistência ao tratamento ainda não são totalmente compreendidos, podendo ocorrer por diversos motivos, incluindo alterações nos alvos das drogas, diferentes níveis de metabolização ou devido a um decréscimo na penetração das drogas antiepilépticas no cérebro.

Os pacientes com epilepsia refratária são, por definição, resistentes a uma ampla variedade de drogas, que por vezes atuam por vias distintas sugerindo que a multi-resistência seja devida à ação de vários mecanismos diferentes que limitam a eficiência das drogas (revisão em Löscher e Schmidt, 2004).

Transportadores de drogas

Um dos mecanismos inicialmente estudados nos processos de resistência, é o que envolve o bombeamento da droga de dentro para fora da célula. Estes estudos avaliaram a glicoproteína P (P-gp) e outros transportadores de drogas, e se iniciaram na oncologia devido ao seu importante papel na resistência aos quimioterápicos (Gottesman e Pastan, 1993). A P-gp parece conferir o fenótipo de resistência a várias drogas através diminuição de seus níveis intracelulares pela sua atividade como uma bomba de efluxo ativa. A P-gp humana é codificada pelo gene *ABCB1* [*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*], também conhecido como *MDR1*, uma proteína de membrana com 1280 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 170 kDa.

A expressão aumentada de transportadores de drogas já foi demonstrada no tecido cerebral de pacientes com epilepsia refratária (Tishler, *et al.*, 1995). Volk e Loscher (2005) avaliaram a expressão de P-gp em modelos animais de epilepsia do lobo temporal respondedores versus resistentes ao tratamento com fenobarbital através de imuno-histoquímica. Os ratos resistentes ao tratamento mostraram uma expressão aumentada da proteína P-gp nas estruturas límbicas, incluindo o hipocampo e esse aumento da expressão estava confinado às células endoteliais que formam a barreira hemato-encefálica.

Uma associação entre resistência a drogas anti-epilépticas e o SNP - C3435T - no gene *ABCB1* foi descrita por Siddiqui, *et al.* (2003), sugerindo que o risco da farmaco-resistência é 2,7 vezes maior em indivíduos CC do que em indivíduos de genótipo TT. Zimprich *et al.* (2004) avaliaram o mesmo gene *ABCB1* em pacientes com epilepsia do lobo temporal e encontraram um bloco de DNA, caracterizado por três SNPs - C1236T, C3435T e G2677T/A - associado com a resistência a drogas. Muitos estudos têm sugerido a importância dos transportadores de drogas na determinação da fármaco-resistência em certos tipos de epilepsias. O gene *ABCB1* (*MRP1*) é o mais estudado, mas faltam dados sobre outros transportadores.

Um exemplo de gene importante nesta via de transporte de drogas é o que codifica a proteína MVP (*major vault protein*), uma proteína presente em vários tecidos do corpo, e particularmente abundante em células tumorais resistentes ao tratamento com quimioterápicos. Van Vliet, *et al.* (2004) relataram um aumento da expressão de MVP em modelos animais de epilepsia do lobo temporal, cujo papel na resistência a drogas tem sido proposto em muitos estudos com linhagens de celulares tumorais e de tumores.

Ainda restam muitas questões a serem respondidas antes de concluirmos se os transportadores de drogas têm um papel na resistência a drogas em epilepsia ou é simplesmente um epifenômeno (Kwan e Brodie, 2005). Se o papel desses transportadores na epilepsia for comprovado, eles representariam um alvo potencial para novas estratégias de tratamento, melhorando o controle das crises epiléticas e a qualidade de vida de muitos indivíduos portadores de epilepsia refratária.

CYP450

Como relatado anteriormente, a CYP450 metaboliza diversos fármacos, o que inclui medicamentos utilizados no tratamento da epilepsia. Sabemos que a CYP2C9 catalisa o metabolismo do fenobarbital e da fenitoína. Em um estudo feito com 60 pacientes, van der Weide *et al.*, 2001 mostraram que pacientes portadores de ao menos um alelo variante deste gene necessitavam de

uma dosagem 37% menor de fenitoína, quando comparados a indivíduos sem a alteração, para a obtenção dos mesmos efeitos farmacológicos. Outros autores demonstraram que alterações em CYP2C9 e CYP2C19 levavam a alterações das propriedades farmacocinéticas de fenobarbital. Aparentemente estas alterações gênicas são comuns. Em um trabalho com um grupo de japoneses, foi demonstrado que 55,4% de 77 indivíduos portadores de epilepsia apresentavam alterações gênicas relevantes.

FARMACOGÊNOMICA E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) apresenta variações clínicas e também diversas mutações possíveis associadas. A própria genética aponta diretamente para a diversidade da doença, pois apenas uma pequena porção dos casos parece seguir um padrão de herança familiar, caracterizada por mutações em três determinados genes (APP e presenilinas 1 e 2), além de um início precoce, que se situa entre os 35 e os 60 anos de idade. No entanto, para a maioria dos casos, não é possível detectar um histórico familiar da doença, que certamente é fruto de efeitos ambientais e de uma combinação de genes de menor efeito que os anteriormente citados, tornando o seu padrão de herança bastante complexo. Apesar disto, os casos de DA familiar ou esporádica apresentam quadros clínicos muito semelhantes, por vezes indistinguíveis. Esta diversidade da doença sugere que, molecularmente, a DA seja um grupo heterogêneo de desordens relacionadas, hipótese que é reforçada pela observação de que nos pacientes com DA somente 50% tenham mostrado uma resposta significativa frente aos inibidores da acetilcolinesterase (Schneider e Farlow, 1995). Na gênese da doença, e também na determinação da resposta terapêutica, diversos genes parecem estar envolvidos.

APOE

Um dos genes mais freqüentemente associados com a DA é o gene codificador para a Apolipoproteína E (ApoE), mapeado no braço longo do

cromossomo 19. Este gene apresenta três formas (ou alelos) distintas na nossa espécie, denominados E2, E3 e E4 (ou $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$). A frequência desses três alelos na população caucasiana em geral é de aproximadamente 8%, 78% e 14% para o APOE $\epsilon 2$, APOE $\epsilon 3$ e APOE $\epsilon 4$, respectivamente (Utermann et al., 1980). O risco de DA conferido pelo alelo $\epsilon 4$ aumenta de forma dose-dependente, ou seja, os indivíduos que são homozigotos para APOE $\epsilon 4$ (~2% da população) têm uma probabilidade de 6 a 8 vezes maior de desenvolver DA do que aqueles homozigotos para APOE $\epsilon 3$. Contudo, o alelo APOE $\epsilon 4$ não é necessário nem suficiente para causar DA; ele apenas aumenta o risco do indivíduo desenvolver a doença (Tanzi e Bertram, 2001).

Aparentemente, os alelos de ApoE também exercem efeitos modulatórios na resposta aos agentes terapêuticos usados para o tratamento da DA (Richard et al., 1997). O alelo ApoE4 parece afetar o nível da atividade da colina acetiltransferase (ChAT) no córtex e no hipocampo, e tem uma correlação com o acúmulo intracerebral das placas neuríticas. Poirier et al., (1995) demonstraram que mais de 80% dos pacientes ApoE4-negativos apresentaram uma melhoria significativa após um tratamento de 30 semanas com a tacrina (um inibidor da acetilcolinesterase), enquanto que 60% dos pacientes ApoE4-positivos apresentaram uma deterioração. O status de ApoE também foi avaliado em relação à resposta clínica a outros compostos. Aparentemente o metrifonato (inibidor da colinesterase) mostrou menor eficiência após 2-4 anos de uso em indivíduos portadores do alelo E4, após um período inicial de 12 meses onde a droga funcionara bem para todos os indivíduos, de modo independente do alelo de ApoE (Poirier e Sevigny, 1998). Os indivíduos portadores de alelos E2 ou E3 mantiveram boa resposta ao tratamento mesmo após 4 anos de uso desta droga. Comportamento semelhante foi observado para a Xanomelina (um agonista colinérgico específico), onde homozigotos para o alelo E4 não apresentaram melhora após tratamento crônico com esta droga. Uma análise de maior número de trabalhos torna aparente que a presença do alelo E4, em homozigose e em alguns casos até mesmo em heterozigose, trás consigo um impacto negativo no tratamento com drogas colinomiméticas. No entanto, pacientes com portadores do

alelo E4 aparentemente responderam bem ao tratamento com a droga Servier-S12024 (morfolinil-2-metoxil-8-tetra-1,2,3,4-quinolina), um agente não-colinérgico do tipo noradrenérgico que parece ter bons resultados na melhoria cognitiva (Richard et al., 1997). De modo similar, o tratamento de indivíduos portadores de alelos E4, em homozigose, com um inibidor da monoamina oxidase B (deprenil) mostrou-se capaz de reduzir a taxa de progressão da doença, o que não foi visto em portadores de alelos E2 ou E3.

Isto indica que os agentes colinomiméticos tais como os inibidores de acetilcolinesterase, devam ser mais eficientes para portadores de alelos E2 ou E3, enquanto que os não-colinomiméticos sejam mais eficientes em casos onde o alelo E4 esteja presente. A associação dos alelos de ApoE se mostra extremamente importante como fator de risco para o desenvolvimento e também parece poder ser utilizada para delinear as melhores estratégias de tratamento dos pacientes acometidos pela DA.

TAU

Estudos recentes sugerem que a fosforilação da proteína Tau esteja associada com a demência da DA (revisto em Mathisen, 2003). Deste modo, a identificação de enzimas envolvidas com este processo de fosforilação, pode indicar potenciais alvos para o tratamento desta doença. Uma das enzimas envolvidas na fosforilação da Tau é a quinase-5 dependente de ciclinas (CDK5). Já foi também observado que p25, um outro ativador da fosforilação de Tau está aumentado no cérebro de pacientes com DA. Em experimentos com modelos animais, foi observado que a super-expressão de CDK5 e de p25 resultou em neurodegeneração e lesões similares às observadas em pacientes com DA (Mathisen 2003), o que indica o forte potencial terapêutico de inibidores de p25 e de CDK5.

Genes associados à inflamação e a apoptose

A identificação de micróglia ativada, citocinas inflamatórias (interleucina1, interleucina-6, e fator de necrose tumoral) e ciclooxigenases geradas por

prostaglandinas (COX-1 e COX-2) em cérebros de pacientes com DA sugere que a inflamação deva ter um papel importante na patogênese dessa doença. O uso de drogas com atividade anti-inflamatória apresenta resultados promissores. Quando modelos animais transgênicos, expressando a APP humana, foram tratados com Ibuprofen, observou-se uma redução de 60% na deposição de placas de beta-amilóide, quando comparados a controles não tratados. As relações farmacogenéticas encontradas entre o genótipo do promotor 5-LOX e a resposta terapêutica anti-inflamatória na DA tem sido alvo de diversos estudos. Os indivíduos de risco para DA carregando polimorfismos específicos do gene 5-LOX devem se tornar uma população alvo para estratégias preventivas ou de tratamento, especialmente no contexto de um histórico familiar significativo de DA ou em combinação com alelos ApoE4. As sugestões de experimentações terapêuticas com os antagonistas de receptores de interleucina-1, os inibidores de interleucina-1, e outras drogas anti-inflamatórias são baseadas na descoberta dos efeitos modulatórios destas drogas no polimorfismo do gene 5-LOX.

Existem fortes evidências de que a apoptose contribua para a morte neuronal em DA. A proteína β -amilóide regula o aumento da produção de moléculas pró-apoptóticas, como Bax, regula a diminuição de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2, e induz a enzima caspatase. Desse modo, uma terapia anti-apoptótica baseada nos inibidores de caspatase é um dos tratamentos promissores de pacientes com DA.

Perspectivas

Sabe-se que, tanto para a DA quanto para diversas outras patologias, não são todos os pacientes responderão a um dado agente terapêutico. Um tratamento eficaz para uma sub-população de pacientes com DA pode não funcionar para todos os pacientes; do mesmo modo, um tratamento desenvolvido para pacientes que apresentem certos alelos ou certas mutações específicas, pode não ter nenhum efeito em outros fenótipos de DA. Essa variabilidade genética associada à resposta aos agentes terapêuticos disponíveis para DA suporta o pensamento que o mecanismo genético da patogênese de subtipos

particulares de DA pode modular a resposta ao tratamento. Devido à importância emergente de genes determinantes em casos esporádicos e nos casos familiares, e seus relacionamentos com respostas a drogas, a genômica será imensamente útil na subclassificação de pacientes da DA. Deste modo, a farmacogenômica traz consigo a promessa de auxiliar na descoberta de tratamentos seletivos gene-baseados e individualizados.

O aumento do crescimento científico a respeito da patobiologia da DA é encorajador. Quanto mais o conhecimento é acumulado, mais próximos ficamos de melhor compreender esta doença, e também mais próximos de uma prescrição médica mais eficaz. A frustração que hoje vivemos, diante da falta de eficácia das drogas disponíveis para o tratamento da DA a longo termo, podem ser reduzidas se formos capazes de agrupar pacientes respondedores de acordo com suas características genéticas. Através de estudos de farmacogenômica os pesquisadores devem se tornar mais bem instrumentados para identificar indivíduos pré-sintomáticos que tenham maior susceptibilidade ao desenvolvimento da DA, buscando deste modo estratégias preventivas mais eficazes.

Bancos de DNA e o futuro da pesquisa genética em doenças humanas

O desenvolvimento características físicas, passando pelas mais simples doenças, e pela nossa resposta às drogas, resulta de complexas interações entre fatores ambientais e os alelos de diversos genes. Deste modo, o estudo em larga escala do genoma e de genes específicos de indivíduos, associados a informações sobre histórico de vida, registros médicos e farmacológicos, pode fornecer dados valiosos sobre mecanismos genéticos que regulam as mais preciosas informações clínicas, passando pela predisposição a doenças e pelos fatores que controlam a resposta a agentes farmacológicos.

Diante da importância desta questão, esforços têm sido feitos em diversos países, em busca de uma maior compreensão a cerca das influências genéticas na vida humana. Sendo assim, muitos países já começaram a implementação de

bancos de DNA, ou estão prestes a fazê-lo. No Canadá foi iniciado um projeto, denominado CARTaGENE, que irá coletar dados e amostras de 60 mil indivíduos. Já o projeto GenomEUtwin, da comunidade europeia, irá incorporar dados de 600 mil pares de gêmeos coletados a nível nacional por diversos projetos anteriores (incluindo um projeto Sueco, que já possui informações de 80 mil pares de gêmeos). O maior e mais bem estruturado projeto mundial parece ser o projeto UK Biobank, estruturado no Reino Unido.

O UK Biobank, coordenado pela Universidade de Manchester, na Inglaterra, representa hoje o maior projeto mundial de bancos de DNA. Este projeto representa um esforço do Reino Unido na confecção de um banco de DNA, composto por amostras de 500 mil voluntários, indivíduos de 45 a 69 anos que fornecerão amostras de sangue após completarem um questionário extenso sobre seus registros médicos, respostas medicamentosas e dados sobre estilo de vida. Os registros médicos destes voluntários serão acompanhados por um período de até 30 anos garantindo uma grande quantidade de uma detalhada informação. Após a associação de amostras e questionários, todos os registros serão tornados anônimos, garantindo a privacidade das informações.

A coordenação deste banco será em Manchester, que estará responsável pelo gerenciamento computacional e financeiro do projeto, incluindo o estoque do material e das informações referentes a cada amostra. Os estudos serão feitos junto com seis centros colaboradores, cada um consistindo em uma rede de instituições acadêmicas e de pesquisas, que irão contribuir no recrutamento dos voluntários, além da elaboração e execução do projeto. No total, 23 universidades do Reino Unido estarão envolvidas. Um comitê científico foi criado sendo coordenado pelo Professor John Bell, da Universidade de Oxford, um renomado especialista no estudo da genética de doenças complexas. Maiores informações podem ser encontradas no website do projeto (www.ukbiobank.ac.uk).

Diante das marcantes características de miscigenação ocorridas em nosso país, seria de grande interesse a existência no Brasil de bancos de DNA similares. O Brasil encontra-se atualmente bem equipado em termos técnicos e humanos, podendo desenvolver projetos de larga escala que busquem identificar

marcadores valiosos para uma população tão diversa. É pouco provável que os dados obtidos em países europeus sejam totalmente aplicáveis na nossa população, devido à mistura ocorrida. Por outro lado, a imensa variedade genética que possuímos é valiosíssima para identificarmos causas genéticas de diferentes níveis de resposta a drogas, diferentes níveis de metabolização, biodisponibilidade ou reações adversas.

Agradecimentos – Os pesquisadores do Laboratório de Neurociências (LIM27) agradecem e reconhecem o importante apoio recebido junto à FAPESP, CNPq e Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog Silva (ABADHS).

Referências bibliográficas

- Allison DB, Mentore JL, Heo M, et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry*, 156: 1686–96, 1999.
- Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, et al. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 53:111-22, 2002
- Dahl ML, Bertilsson L. Genetically variable metabolism of antidepressants and neuroleptic drugs in man. *Pharmacogenetics*, 3:61-70, 1993.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 62:385-427, 1993.
- Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 46:224-35, 2005.
- Lander, ES, Linton, LM, Birren, B, et al - Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921, 2001.
- Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res*, 50:3-16, 2002.
- Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. *Epilepsy Res*, 60:77-159, 2004.

- Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun*, 225:1068–72, 1996.
- Mathisen, PM. Gene discovery and validation for neurodegenerative diseases. *Drug Discov Today*. 8:39-46, 2003.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM Serotonin receptors in the human brain—III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience*, 21: 97–122, 1987.
- Poirier J, Delisle MC, Quirion R, et al. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:12260-4, 1995.
- Poirier J and Sevigny P. Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 53:199-207, 1998
- Richard F, Helbecque N, Neuman E, et al. APOE genotyping and response to drug treatment in Alzheimer's disease. *Lancet*. 349:539, 1997.
- Schneider LS, Farlow M. Combined tacrine and estrogen replacement therapy in patients with Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 826:317-22, 1997.
- Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*, 348:1442-8, 2003.
- Tanzi, RE, Bertram, L. – New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32: 181-4, 2001.
- Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, et al. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36:1-6, 1995.
- Utermann, G, Langenbeck, U, Beisiegel, U, et al. – Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 32: 339-47, 1980.
- van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics*.11:287-91, 2001.

- van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, et al. Expression and cellular distribution of major vault protein: a putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 45:1506-16, 2004.
- Venter, JC, Adams, MD, Myers, EW et al - The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304–51, 2001.
- Volk HA, Loscher W. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*, 16, 2005
- Yamada J, Sugimoto Y, Yoshikawa T, et al. The effects of peripheral serotonin₂ receptor agonist on food intake of rats. *Adv Exp Med Biol*, 398: 555–7, 1996.
- Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 63:1087-9, 2004.

ANEXO B

Artigo aceito para publicação na revista *Journal of Neuroimmunology*

Autores: Cardoso, CC; Martinez, AN; Guimarães, PEM; **Mendes, CT**; Pacheco, AG; Oliveira, RB; Teles, RMB; Llarramendi, X; Sampaio, EP; Sarno, EN; Dias-Neto, E; Moraes, MO. Nijmegen 1 as p110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *Journal of Neuroimmunology* 2007; Sep 5.

Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage[☆]

Cynthia Chester Cardoso^a, Alejandra Nóbrega Martinez^a, Pedro Edson Moreira Guimarães^b,
Camila Teixeira Mendes^{b,c}, Antônio Guilherme Pacheco^d, Rosane Barbosa de Oliveira^a,
Rosane Magda Brandão Teles^a, Ximena Illarramendi^a, Elizabeth Pereira Sampaio^a,
Euzenir Nunes Sarno^a, Emmanuel Dias-Neto^{b,e}, Milton Ozório Moraes^{a,*}

^a Leprosy Laboratory, Mycobacterioses Department, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-360, Brazil

^b Laboratório de Neurociências (LIM27), Instituto e Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, USP,

Rua Dr Ovídio Pires de Campos s/n, Consolação, São Paulo, SP, Brazil

^c Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS), Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^e University of Texas, MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd, Unit 1374, 77030, Houston, TX, USA

Received 16 April 2007; received in revised form 18 July 2007; accepted 18 July 2007

Abstract

Leprosy is the major cause of non-traumatic neuropathy. Herein, we investigated the role of ninjurin 1, an adhesion molecule involved in nerve regeneration in leprosy. Our results demonstrated that *M. leprae* stimulates *in vitro* up-regulation of ninjurin mRNA in cultured Schwann and blood cells as well as *in vivo* mRNA and protein expression in leprosy nerve biopsies. A polymorphism (asp110ala) was investigated in a case–control study (1123 individuals) and no association was found with leprosy *per se* or with disseminated forms. Nevertheless, ala110 was associated with functional nerve impairment (OR=2.42; $p=0.02$ for ala/ala) and with lower mRNA levels. Our data suggests that asp110ala could be a valuable genetic marker of nerve damage in leprosy.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ninjurin; Single nucleotide polymorphism; Neuroprotection; Leprosy; Population

1. Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Macrophages in skin and Schwann cells in peripheral nerves are the main cells infected by *M. leprae*. The unique tropism of *M. leprae* to Schwann cells is mediated by $\alpha 2$ -laminin, a extracellular matrix protein which binds α -dystroglycan in the cell membrane (Rambukkana, 2001). According to the Ridley–Jopling (1966) classification leprosy has several clinical forms ranging from a localized form of the disease, tuberculoid leprosy (TT), to a disseminated form, lepromatous leprosy (LL). Three intermediate forms – borderline

tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL) – are also observed. These clinical manifestations are defined by immunological patterns with TT and LL patients representing Th1 and Th2 polar immune responses, respectively (Yamamura et al., 1991). In addition, throughout the natural history of the disease patients can develop two kinds of reaction episodes, either erythema nodosum leprosum (ENL) or reversal reactions (RR), which are characterized by a reactivation of the immune response (Moraes et al., 1999). Patients exhibiting RR or ENL are more likely to develop neuropathies (Rea and Sieling, 1998).

In spite of the great success of multidrug therapy (MDT) in disease treatment, leprosy is still the major cause of non-traumatic neuropathy (Ooi and Srinivasan, 2004). About 20–30% of the patients develop some kind of nerve impairment that can evolve to disability and handicap along the course of the

[☆] This work was supported by FIOCRUZ/CNPq PAPES IV, CNPq/DCIT.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25984467; fax: +55 21 22709997.

E-mail address: mmoraes@fio cruz.br (M.O. Moraes).

disease. Nerve inflammation (neuritis) is believed to be a crucial step in this pathway leading to permanent nerve damage. Disability grade, when present, is one of the key clinical parameters that indicate nerve impairment (Nienhuis et al., 2004; Pimentel et al., 2004).

Schwann cells play pivotal roles in regeneration after neuronal damage by secreting nerve growth factors, cell surface and adhesion molecules. Moreover, one of the events following nerve injury is a rapid decrease in myelin synthesis. Although still controversial, since there are other mechanisms of nerve damage in leprosy (Spierings et al., 2001), it seems that *M. leprae* infection induces demyelination (Rambukkana et al., 2002). Some results suggested that the mere presence of the bacilli can induce demyelination and trigger nerve injury (Tapinos et al., 2006). On the other hand, results of a rat Schwann cell-neuron co-culture suggested that the infection alters Schwann cell morphology, but does not modify myelin architecture (Hagge et al., 2002). The ability of lipopeptides to induce apoptosis in Schwann cells through TLR2 activation (Oliveira et al., 2003) corroborates the idea of direct nerve injury induction by *M. leprae*. Thus, the ability to promptly respond to damage by secreting nerve protective molecules could avoid an increase in lesions and further neuronal complications.

The influence of host genetics in immune responses is clearly observed in susceptibility to leprosy *per se* and/or its clinical forms (Moraes et al., 2006). This has been confirmed by studies that provided positive association results for variants in genes encoding TNF (Shaw et al., 2001; Santos et al., 2002; Moraes et al., 2001), LTA (Alcais et al., 2007), HLA (Vanderborcht et al., 2007) IL-10 (Santos et al., 2002; Moraes et al., 2004; Malhotra et al., 2005), vitamin D receptor (Roy et al., 1999; Fitness et al., 2004) and parkin (Mira et al., 2004), among others (Moraes et al., 2006). Nevertheless, genetic epidemiology studies to elucidate mechanisms of nerve damage have not been undertaken.

Ninjurin 1 is a homophilic adhesion molecule expressed in many tissues including peripheral nerves, especially in Schwann cells and ganglion neurons (Araki and Milbrandt, 1996). It has been suggested that the ninjurin gene, *NINJI*, could play a role in nerve regeneration since it is upregulated during axotomy or nerve damage, promoting neurite outgrowth (Araki and Milbrandt, 1996; Kubo et al., 2002). Also, strong *NINJI* mRNA expression has been detected in liver of hepatocellular carcinoma patients with hepatitis and/or cirrhosis, being more abundant in regenerating and tumor samples than in the normal liver (Kim et al., 2001). *NINJI* was also identified by cDNA microarrays as a marker of B-lineage acute lymphoblastic leukemia while its protein was overexpressed in the CD10⁺/CD19⁺ leukemic B cell, as detected by fluorescent cytometry (Chen et al., 2001).

We hypothesized that the course of leprosy neuropathy may be affected by the level of protective molecules, like ninjurin, produced *in situ*. In this study we investigated the effects of *M. leprae* on *NINJI* mRNA expression *in vitro* in peripheral blood mononuclear cells and Schwann cells as well as on mRNA and protein production *in vivo* in nerve and/or skin biopsies obtained from leprosy and other neuropathy patients. Moreover, a single nucleotide polymorphism (SNP) in its coding region,

asp110ala, was analyzed in a case–control study using DNA samples from 1123 individuals.

2. Materials and methods

2.1. Patients

A total of 765 patients (275 females and 490 males) were included in this study. Diagnosis was determined by experienced professionals from the Souza Araújo clinic, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Patients were classified as pauci or multibacillary and treated according to World Health Organization (WHO) specifications. Ridley and Jopling classification was determined after histopathological analysis (Ridley and Jopling, 1966) and disability grade was determined before treatment according to WHO recommendations as described (Pimentel et al., 2004). Briefly, function of eyes, hands and feet were analyzed and each received a grade ranging from 0 to 2 at diagnosis, prior to treatment. The highest grade received was considered the disability grade of the patient. General characteristics of patient groups are summarized in Table 1. The control group was composed of 358 individuals, 129 men and 229 women with an average age of 33.5±9.5 (mean±standard deviation). This group included unrelated individuals from the same endemic area as the patients (Rio de Janeiro, Brazil). As performed for the patient group, controls were ethnically classified according to morphological characteristics of the individual and his/her family as black (12%; *n*=44), caucasoid (53%; *n*=185) or mestizo (35%; *n*=122). Written informed consent was obtained from all individuals included in the study as required by the local ethics committee (CEP-FIOCRUZ).

2.2. Nerve and skin biopsy collection

Nerve biopsies were collected from 12 individuals without any skin lesions but with either clinical signs (nerve

Table 1
General characteristics of patients group in its total number and according to disability grade

		Leprosy patients ^a		
		Total	DG=0	DG>0
Age (mean±SD)		34.7±18.6	31±18	43±19
Ethnicity	Caucasoids	257	140	96
	Mestizoes	183	109	62
	Black	60	37	22
Classification used for treatment	Paucibacillary	216	133	46
	Multibacillary	355	177	148
Clinical forms according to Ridley and Jopling classification	LL	117	55	54
	BL	130	66	53
	BB	86	48	27
	BT	121	90	16
	TT	6	5	0
	PNL	43	2	24
	I	27	22	3
Reaction	Presence	294	160	124
	Absence	150	96	39

^a The number of individuals in each parameter may be different from the total number of genotyped patients due to missing information.

enlargement, and/or nerve pain and/or peripheral neuropathy) or electrophysiological alterations (Jardim et al., 2003), suggesting pure neuritic leprosy. Skin biopsies were collected from 3 individuals undergoing erythema nodosum leprosum reaction and 2 lepromatous individuals without reaction.

2.3. Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh blood of 3 different donors using Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, USA) density centrifugation. Cells were suspended in RPMI 1640 complete medium (Gibco, NY, USA) and cultivated in presence or absence of *M. leprae* (1 µg/ml) for different times from 1 to 12 h as described (Sampaio et al., 1998). Alternatively, Schwann cells (SCs) obtained from 2 healthy donors and from the ST8814 lineage were cultured in presence or absence of *M. leprae* (20 µg/ml) for 3 h. Armadillo-derived *M. leprae* antigen was kindly provided by Dr. Patrick Brennan, (Colorado State University, CO, USA).

2.4. RNA extraction

For RNA purification, frozen biopsy fragments were homogenized using Politron PT 3000 and cells (PBMCs or SCs) were recovered from 6-well plates after stimulation for different times. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and 1 µg was reverse transcribed using 200 U Superscript II and 0.5 µg of oligo-dT according to manufacturer's recommendations (Invitrogen, CA, USA).

2.5. Reverse transcription real time PCR

Quantitative RT-PCR was performed in a 7000 Sequence Detection System, using TaqMan systems (Applied Biosystems, CA, USA) specific for human ninjurin1 (assay-by-design SNP_185306873_319792) and GAPDH (catalog number 4333764-F) cDNA amplification. Real time PCR reactions were carried out in a final volume of 10 µL, composed of 1X TaqMan PCR Universal Master Mix, 300 nM of each primer and 100 nM of each probe, according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Cycle conditions for amplification were 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. After the PCR, the variation of threshold cycles (ΔC_t) between the ninjurin and GAPDH genes was calculated for all samples (C_t ninjurin minus C_t GAPDH). Relative ninjurin1 amounts were determined by $2^{-\Delta C_t}$ values, which represent the fold increase in *NINJI* mRNA expression (Relative Quantitation Getting Started Guide <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04347824.pdf>).

2.6. Immunohistochemical staining

Fixation and immunostaining were performed as previously described (Sampaio et al., 1995). Briefly, all biopsies were fixed in phosphate-buffered paraformaldehyde solution (4%), embedded in paraffin and stained with hematoxylin–eosin (H&E) and Wade (for acid-fast bacilli). Another fragment was snap

frozen, cut using cryostat and incubated with mouse anti-ninjurin (Becton & Dickinson, CA, USA), rinsed with PBS and incubated with secondary antibody. Avidin-biotin system (Vector, CA, USA) and DAB were used for staining.

2.7. Genotyping of *asp110ala* SNP

DNA was extracted from frozen blood samples using DNAzol[®] reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA). *NINJI* polymorphism (rs2275848) screening was performed using PCR amplification followed by restriction enzyme digestion (PCR-RFLP). PCR amplifications were carried out in 25 µl reactions using 25–100 ng of genomic DNA as template in tubes containing 1.0 U *Taq* DNA polymerase with 1X of the buffer supplied by the manufacturer (Invitrogen, CA, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and 0.3 µM of each primer. Primers used for genotyping were 5'-CTC TGG GCG ACA AAA CTC ATC C-3' (*NINJI*F) and 5'-CCA GGT TGT TGA GGA AGT CCA G-3' (*NINJI*R). Amplification cycles included a denaturing step at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles set at 94 °C for 40 s, 63 °C for 40 s and 72 °C for 40 s and a final extension at 72 °C for 7 min. Digestions were carried out in a final volume of 20 µl containing 3 U of *Hae*III, 1X NEB buffer 2 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and 15 µl of PCR products. Reactions were incubated overnight at 37 °C and digested fragments were separated in 3% ethidium bromide stained agarose gels. A *Hae*III cleavage site is generated when the C allele (*asp110*) is present, in way that the genotypes were easily ascertained by the size of the fractionated fragments (213 bp for the A allele; 177 + 36 bp for the C allele).

2.8. Statistical analysis

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were tested with χ^2 tests. Analyses of genotypic and allelic frequencies of *ala110asp* SNPs in patients vs controls; MB vs PB and DG=0 vs DG<0 were carried out by weighted logistic regression models with or without correction for sex, ethnicity and reaction using R software (R Development Core Team, 2005). Messenger RNA expression data were analyzed by the Mann–Whitney test using Graph Pad Prism software (version 2.01, 1996).

3. Results

First, we analyzed whether *NINJI* mRNA expression in PBMCs and SCs would be modulated following *in vitro* exposure to *M. leprae*. Through quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis, we found that *M. leprae* stimulus was able to induce *NINJI* mRNA expression in PBMCs after 3–6 h of exposure (Fig. 1A). This induction profile was also observed in SC cultures after 3 h in the presence of *M. leprae*. These results were the same for both SCs obtained from the ST8814 lineage (Fig. 1B), which showed a very important induction in response to *M. leprae*, and primary cultures, where induction was less prominent (Fig. 1C). In order to confirm whether ninjurin was

Fig. 1. Ninjurin mRNA expression is induced *in vitro* by *M. leprae* stimulus and *in vivo* in leprosy lesions. Results are represented in mean±standard error. (A) PBMCs were obtained from fresh blood of 3 different donors and cultivated in presence or absence of *M. leprae* (1 µg/ml). (B) Schwann cells from the ST8814 lineage were cultivated in the presence or absence of *M. leprae* stimulus (20 µg/mL) for 3 h (mean of 3 different experiments is presented). (C) Primary cultures of Schwann cells obtained from 2 different donors were cultivated in the same conditions mentioned in B. (D) Skin biopsies of leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL, *N*=3) and lepromatous individuals without reaction (LL, *N*=2). The standard bars are not seen due to the low values of standard error calculated for this group. Ninjurin 1 mRNA levels were determined by real time PCR and normalized by GAPDH levels. The ΔCt values (ninjurin Ct minus GAPDH Ct) obtained were used in the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$, as described in Methods.

modulated *in vivo* by infection with *M. leprae*, we analyzed mRNA expression in skin biopsies of 5 individuals: 2 LL and 3 ENL patients. As expected for an adhesion molecule, ninjurin was expressed in skin lesions of both groups (Fig. 1D).

Next, we investigated ninjurin expression *in vivo* by immunohistochemistry in 12 nerve biopsies collected for routine H&E. Six representative samples are shown in Fig. 2. Presence of *M. leprae* DNA was evaluated in all samples by

Fig. 2. Ninjurin expression in nerve biopsies of patients with leprosy or other non-leprosy neuropathies. Nerve biopsies were collected from patients (6 representative patients were selected) and submitted to routine stains for the purpose of diagnosis and immunohistochemistry. In brief, criostat sections of frozen nerve biopsies were incubated with mouse anti-ninjurin antibody, then incubated with secondary anti-mouse antibody and developed with the vectastain ABC kit. Negative controls were performed by omitting the primary antibody (not shown). A and B—Two patients with non-leprosy neuropathy showing low ninjurin staining (brown red staining) in Schwann cells (arrows). C, D, E and F—Four patients with PNL. C and D—Biopsies showing diffuse inflammatory mononuclear infiltrates in the presence or absence of AFB. E and F—Nerve biopsies showing epithelioid granuloma and fibrosis in the absence of AFB. Ninjurin staining can be detected both in Schwann cells and inflammatory infiltrate (arrow-heads). 40× augmentation was used.

Table 2
Frequency of *NINJI* asp110ala polymorphism in leprosy patients and healthy controls

asp110ala ^a	Controls	Cases	OR (<i>p</i> -value)	OR (<i>p</i> -value) _{cor} ^b	MB	PB	OR (<i>p</i> -value)	OR (<i>p</i> -value) _{cor} ^b
asp/asp ^c	221 ^(0.62)	456 ^(0.60)	—	—	267 ^(0.60)	189 ^(0.59)	—	—
asp/ala	124 ^(0.35)	269 ^(0.35)	1.05 (<i>p</i> =0.71)	1.16 (<i>p</i> =0.29)	149 ^(0.34)	120 ^(0.37)	1.14 (<i>p</i> =0.4)	1.06 (<i>p</i> =0.73)
ala/ala	13 ^(0.04)	40 ^(0.05)	1.49 (<i>p</i> =0.22)	1.36 (<i>p</i> =0.38)	28 ^(0.06)	12 ^(0.04)	0.6 (<i>p</i> =0.16)	0.5 (<i>p</i> =0.09)
asp ^c	566 ^(0.79)	1181 ^(0.77)	—	—	683 ^(0.77)	498 ^(0.78)	—	—
ala	150 ^(0.21)	349 ^(0.23)	1.12 (<i>p</i> =0.48)	1.16 (<i>p</i> =0.37)	205 ^(0.23)	144 ^(0.22)	0.96 (<i>p</i> =0.83)	0.89 (<i>p</i> =0.55)
ala carriers	137 ^(0.38)	309 ^(0.40)	1.09 (<i>p</i> =0.48)	1.18 (<i>p</i> =0.23)	177 ^(0.40)	132 ^(0.41)	1.05 (<i>p</i> =0.73)	0.97 (<i>p</i> =0.85)

Comparisons between cases and controls were performed using logistic regression models, with OR and *p*-values calculation.

^a This polymorphism is deposited at dbSNP as rs2275848.

^b OR and *p*-value corrected for sex and ethnicity as covariates.

^c Baseline group.

PCR (Martinez et al., 2006) and pure neuritic leprosy (PNL), a clinical form in which patients do not have skin lesions, was confirmed in 9 out of 12 patients. The remaining patients were excluded for leprosy, however, they still exhibited neurological disturbances. Staining with anti-ninjurin antibody delineated the outlayer of the axon-Schwann cell unit (Fig. 2A–D, arrows). This pattern is consistent with Schwann cell positivity (Fig. 2A–E). Interestingly, in the absence of any histological findings of leprosy, ninjurin staining was poorly detected (Fig. 2A and B), while patients positive for PNL, with or without inflammatory complications, showed a stronger signal for this protein (Fig. 2C to F). Furthermore, strong ninjurin staining was seen in the inflammatory infiltrate (Fig. 2E and F, arrow-heads) of leprosy nerve biopsies.

In order to evaluate if a genetic polymorphism in the ninjurin gene could affect the course of the disease following *M. leprae* infection, we investigated the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *NINJI* gene and found a non-synonymous A–C transversion in the third exon, resulting in an amino acid change at position 110 (asp110ala). This SNP was then evaluated in a case–control study with a total of 765 patients and 358 controls. Both populations were in Hardy–Weinberg equilibrium for this SNP. The distribution of asp110ala genotypic and allelic frequencies was also evaluated in patients exhibiting localized (paucibacillary — PB) or disseminated (multibacillary — MB) forms of the disease. Logistic regression models were used for comparisons between groups. No differences were observed in the frequency of the asp110ala SNP between patients and healthy individuals or between MB and PB groups (Table 2).

Next we evaluated if this SNP was associated to leprosy neural damage, measured herein by the disability grade (DG). The DG of the patients has been broadly used in leprosy programs to access the extension of nerve commitment and has been very useful in setting up preventive measures to avoid permanent damage. The evaluation is based on the WHO disability grade score and is performed routinely in all recently diagnosed leprosy patients (Pimentel et al., 2004). Patients with grade 0 were considered as having no disability while patients with disability were those with scores 1 and 2 (grade 1 reflects sensory nerve impairment while grade 2 is associated with motor nerve lesions). For statistical comparisons, we only considered absence (DG=0) or presence (DG>0) of initial (before MDT treatment) disability grade.

Logistic regression analyses showed a significant difference between genotypic frequencies of asp110ala from the two groups (Table 3), with a global *p*-value of 0.01 before and after correction for the covariates sex and ethnicity. Comparisons between allelic frequencies and ala110 carriers in these groups also provided significant differences, with ORs indicating risk in presence of ala110 either before or after correction for covariates (Table 3). Furthermore, we noticed that ala/ala homozygotes had a higher risk (crude OR=2.26; adjusted OR=2.42) of developing disability than heterozygotes (crude OR=1.44; adjusted OR=1.56) when compared to asp/asp homozygotes (baseline), suggesting an allele dose effect. These results strongly suggest an association between the ala110 allele and development of disability in leprosy patients.

Leprosy reactions are generally associated with neural damage (Pimentel et al., 2004) and thus could serve as confounder effects

Table 3
Frequency of asp110ala polymorphism in leprosy patients according to disability grade (DG)

asp110ala	DG=0	DG>0	OR (<i>p</i> -value)	OR (<i>p</i> -value) _{cor} ^a	OR (<i>p</i> -value) _{cor} ^b
Asp/asp ^c	275 ^(0.64)	143 ^(0.53)	—	—	—
Asp/ala	137 ^(0.32)	103 ^(0.39)	1.44 (<i>p</i> =0.03)	1.56 (<i>p</i> =0.002)	1.83 (<i>p</i> =0.008)
Ala/ala	17 ^(0.04)	20 ^(0.08)	2.26 (<i>p</i> =0.02)	2.42 (<i>p</i> =0.02)	1.86 (<i>p</i> =0.17)
asp ^c	687 ^(0.80)	389 ^(0.73)	—	—	—
ala	171 ^(0.20)	143 ^(0.27)	1.48 (<i>p</i> =0.03)	1.56 (<i>p</i> =0.02)	1.59 (<i>p</i> =0.06)
ala carriers	154 ^(0.36)	123 ^(0.46)	1.54 (<i>p</i> =0.007)	1.66 (<i>p</i> =0.002)	1.84 (<i>p</i> =0.005)

Comparisons between groups were performed using logistic regression models, with OR and *p*-values calculation. Global comparisons provided *p*-values of 0.01 both with and without correction for covariates sex and ethnicity and 0.02 after inclusion of reaction in the correction.

^a OR and *p*-value corrected for covariates sex and ethnicity.

^b OR and *p*-value corrected for covariates sex, ethnicity and reaction (considering presence or absence).

^c Baseline group.

Fig. 3. Ala110 allele reduces *NINJI* mRNA expression. Nerve biopsies were obtained from patients of different genotypes for asp110ala SNP. Ninjurin mRNA relative amounts from carriers ($n=9$) and non-carriers ($n=3$) of ala110 allele were quantified by real time PCR. Results are shown in $2^{-\Delta C_t}$, calculated in relation to GAPDH levels. Results are represented in mean $\pm$ standard error.

in our study. We, therefore, also used the status of reaction (presence or absence) as a covariate, along with sex and ethnicity. In spite of the loss of allele dose effect, results confirmed the association of asp110ala to DG development (global p value=0.02) and ala110 carriers as the risk group (OR=1.84; $p=0.005$) indicating that genetic association of ninjurin acts as an independent component in nerve damage.

In order to test if there is a functional role of this polymorphism in leprosy, we analyzed *NINJI* mRNA expression in nerve biopsies according to their genotype for the asp110ala SNP. We found that ala110 carriers (asp/ala and ala/ala) had lower mRNA levels (0.08 ± 0.03 ; $n=9$) when compared to asp110 homozygotes (0.14 ± 0.06 ; $n=3$), although no statistical significance was found (Fig. 3).

4. Discussion

The *NINJI* gene is located in the 9q22 chromosomal region, which had been previously linked to hereditary sensory neuropathies type I and type II (Chadwick et al., 1998), although no clear association with *NINJI* has been confirmed as of yet (Mandich et al., 1999). The role of ninjurin in other neuropathies has not been examined previously. We, therefore, set out to evaluate the role of the adhesion molecule ninjurin 1 in the interaction of *M. leprae* with the human host. Our results have shown that the *NINJI* gene was induced after *M. leprae* stimulation *in vitro* and that ninjurin was expressed in skin lesions obtained from leprosy patients in different clinical situations. Also, ninjurin 1 immunohistochemical staining was positive in nerve biopsies and stronger in leprosy patient samples, suggesting its upregulation as a result of nerve injury caused by *M. leprae* infection and/or leprosy outcome. Thus, ninjurin was shown to be up-regulated not only after traumatic neuronal events, but also after *M. leprae* encounter/infection, which is consistent with the attributed role of ninjurin as a neuroprotective molecule.

Adhesion molecules can provide suitable substrates for nerve regeneration. Neutralizing ninjurin in culture medium decreased neuron survival and neurite outgrowth. It seems that the physical contact of neurons and co-cultured cells (skin-derived or Schwann cells) is important in mediating this survival signal

(Jerregard, 2001). Indeed, in *Drosophila*, the cleavage of the ninjurin ectodomain mediated by metalloproteases induces a loss of adhesion (Zhang et al., 2006). We observed that *NINJI* is up-regulated during *M. leprae* stimulation *in vitro* and by inflammatory reactions *in vivo* as a result of neuronal injury. It also seems that ninjurin expression in nerve biopsies was not specific to leprosy patients.

We then asked whether ninjurin participation in tissue regeneration after development of leprosy could be influenced by genetic background. To test this hypothesis, we searched for polymorphisms in the *NINJI* gene and performed a case–control study using a non-synonymous SNP, asp110ala, as a marker. We did not find any association of this SNP to leprosy *per se*. We compared localized (PB) and disseminated (MB) forms of leprosy. Although this classification only provides a simplified view of the complex diversity observed in the clinical forms of leprosy, a simple comparison of PB vs MB forms provides an idea of the possible differences between a group of patients capable of restricting the growth, number and spread of bacilli (PB) and another group (MB) of patients where bacilli duplicate and spread freely. But, once again, no association was found.

Since only 30–40% of the patients develop nerve impairment, we hypothesized that *NINJI* could be important for this variability observed among patients, as ninjurin might modulate nerve impairment outcome in a select group of individuals. We, therefore, tested if the asp110ala SNP was associated to leprosy nerve damage, measured by disability grade. Although disability grade may not be the ideal clinical parameter for measuring nerve damage, it is capable of correctly establishing degrees of nerve disturbance. Other methods, such as electrophysiological evaluation, could have been used to compare degrees of peripheral neuropathy, however, it was not possible to apply these methods to all patients in our routine clinic, which lead us to use DG.

Our results showed that this SNP was, indeed, associated to the DG of leprosy patients. Also, carriers of the ala110 allele were more susceptible to developing nerve impairment, measured by DG. Finally, we also found that ala110 carriers expressed lower levels of *NINJI* mRNA in nerve biopsies. The protective role of ninjurin within nerves indicates that ala110 patients with disability grades would produce lower ninjurin levels and, therefore, be more likely to boost neuronal damage. Our data suggest that ninjurin could counteract the aggressive effects of neuronal damage during the inflammatory process that occurs as a result of *M. leprae* infection/inflammation.

The asp110ala SNP may also be in linkage disequilibrium with a promoter or a 3'UTR SNP which may, in turn, regulate ninjurin expression. In this case, the entire block (as a haplotype) could affect ninjurin levels and consequently its neuroprotective action. In fact, ala110 allele carriers expressed lower mRNA than asp110 carriers in the small sample of biopsies tested. Thus, these results could explain, in part, the increased frequency of ala110 among patients exhibiting disability grade. Our data suggest that genetic screening for this asp110ala polymorphism could be used as a valuable tool, along with a thorough clinical examination for early detection of patients with higher risk of developing nerve impairment, in order to prevent disability in leprosy.

Our study was the first to investigate this *NINJI* SNP in a human disease, and the results suggest that the ala110 allele is associated with nerve damage as measured by the DG scale. This amino acid change was predicted by Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) to be benign, but it could lead to subtle alterations in the structure/function of the protein with consequences to its binding or signaling capabilities. Moreover, when evaluating nucleotide databases, we noticed that the asp110 allele is only present in humans. Even closer primate species such as chimpanzees contain only the ala110 variant, which seems to be an ancestral allele. The analysis of this region in armadillos, which is the only available experimental model of leprosy that exhibits neuritis-like clinical symptoms, was also unable to identify the polymorphism (James Adams and Richard Truman, personal communication). It is interesting to note that aside from being characteristic of humans, the asp110 allele is also the most prevalent, with frequencies ranging from 61% in Yoruba populations from Nigeria to 92% in China according to the HapMap project (<http://www.hapmap.org>). Since the asp110 allele exhibits a higher frequency in humans as compared to ala110, it is tempting to speculate that selective pressures towards asp110 may have provided functional advantages for humans such as resistance to peripheral neuropathy caused mainly by *M. leprae* in the past. This hypothesis also indicates that this SNP could also be participating in other neurodegenerative diseases. Nevertheless, it is clear that neurological damage in leprosy is a complex trait and several genes may influence the outcome of the disease. Thus, our contribution only points to one of the several genes and SNPs involved in susceptibility to nerve injury in leprosy.

In this context, the general idea suggesting that ninjurin is a neuroprotective molecule is reinforced by our results because 1) there is an increased fitness for carriers of the asp110 allele concerning *M. leprae* neuropathology and 2) asp110 individuals produce higher mRNA levels, which is consistent with their resistance to nerve damage in leprosy.

Acknowledgements

We would like to thank José Augusto da Costa Nery and Anna Maria Sales for the clinical support, essential to the development of this work. We are also grateful to Valcemir F. Silva-Filho and Viviane Maniero for technical assistance, Denise Vieira for sample collection and Anna Beatriz Robottom Ferreira for the English revision of the paper. CCC, ANM and EDN are supported by CNPq. EDN thanks ABADHS for their support to the Laboratory of Neurosciences.

References

- Alcais, A., Alter, A., Antoni, G., Orlova, M., Van Thuc, N., Singh, M., Vanderborght, P.R., Katoch, K., Mira, M.T., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Moraes, M., Mehra, N., Schurr, E., Abel, L., 2007. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat. Genet.* 39 (4), 517–522.
- Araki, T., Milbrandt, J., 1996. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 17, 353–361.
- Chadwick, B.P., Heath, S.K., Williamson, J., Obermayr, F., Patel, L., Sheer, D., Frischauf, A.M., 1998. The human homologue of the ninjurin gene maps to the candidate region of hereditary sensory neuropathy type I (HSNI). *Genomics* 47 (1), 58–63.
- Chen, J.S., Coustan-Smith, E., Suzuki, T., Neale, G.A., Mihara, K., Pui, C.H., Campana, D., 2001. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97, 2115–2120.
- Fitness, J., Floyd, S., Wardorff, D.K., Sichali, L., Waungulu, L.M., Crampin, A.C., Fine, P.E.M., Hill, A.V.S., 2004. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71 (3), 330–340.
- Hagge, D.A., Oby Robinson, S., Scollard, D., McCormick, G., Williams, D.L., 2002. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *J. Infect. Dis.* 186, 1283–1296.
- Jardim, M.R., Antunes, S.L., Santos, A.R., Nascimento, O.J., Nery, J.A., Sales, A.M., Illarramendi, X., Duppre, N., Chimelli, L., Sampaio, E.P., Sarno, E.M., 2003. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J. Neurol.* 250 (7), 806–809.
- Jerregard, H., 2001. Sensory neurons influence the expression of cell adhesion factors by cutaneous cells in vitro and in vivo. *J. Neurocytol.* 30, 327–336.
- Kim, J.W., Moon, A.R., Kim, J.H., Yoon, S.Y., Oh, G.T., Choe, Y.K., Choe, I.S., 2001. Up-regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol. Cells* 11, 151–157.
- Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Hosokawa, K., Tohyama, M., 2002. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J. Neurochem.* 82, 1129–1136.
- Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., Relhan, V., Reddy, B.S., Bamezai, R.N., 2005. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum. Genet.* 118 (2), 295–300.
- Mandich, P., Bellone, E., Di Maria, E., Pigullo, S., Pizzuti, A., Schenone, A., Soriani, S., Varese, A., Windebank, A.J., Ajmar, F., 1999. Exclusion of the ninjurin gene as a candidate for hereditary sensory neuropathies type I and type II. *Am. J. Med. Genet.* 83, 409–410.
- Martinez, A.N., Britto, C.F., Nery, J.A., Sampaio, E.P., Jardim, M.R., Sarno, E.N., Moraes, M.O., 2006. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 44 (9), 3154–3159.
- Mira, M.T., Alcais, A., VanThuc, N., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Thai, V.H., Phuong, M.C., Huong, N.T., Ba, N.N., Khoa, P.X., Sarno, E.N., Alter, A., Monpetit, A., Moraes, M.E., Moraes, J.R., Doré, C., Gallant, C.J., Lepage, P., Verner, A., Van de Vosse, E., Hudson, T.J., Abel, L., Schurr, E., 2004. Nature 427 (6975), 636–640.
- Moraes, M.O., Sarno, E.N., Almeida, A.S., Saraiva, B.C., Nery, J.A., Martins, R.C., Sampaio, E.P., 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol.* 50 (5), 541–549.
- Moraes, M.O., Duppre, N.C., Suffys, P.N., Santos, A.R., Almeida, A.S., Nery, J.A., Sampaio, E.P., Sarno, E.N., 2001. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53 (1), 45–47.
- Moraes, M.O., Pacheco, A.G., Schonkeren, J.J., Vanderborght, P.R., Nery, J.A., Santos, A.R., Moraes, M.E., Moraes, J.R., Ottenhoff, T.H., Sampaio, E.P., Huizinga, T.W., Sarno, E.N., 2004. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 5 (7), 592–595.
- Moraes, M.O., Cardoso, C.C., Vanderborght, P.R., Pacheco, A.G., 2006. Genetics of host response in leprosy. *Lepr. Rev.* 77 (3), 189–202.
- Nienhuis, W.A., van Brakel, W.H., Butlin, C.R., van der Werf, T.S., 2004. Measuring impairment caused by leprosy: inter-tester reliability of the WHO disability grading system. *Lepr. Rev.* 75, 221–232.
- Oliveira, R.B., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Rea, T.H., Rambukkana, A., Sarno, E.N., Modlin, R.L., 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect. Immun.* 71, 1427–1433.

- Ooi, W.W., Srinivasan, J., 2004. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. *Muscle Nerve* 30 (4), 393–409.
- Pimentel, M.I., Nery, J.A., Borges, E., Goncalves, R.R., Sarno, E.N., 2004. Impairments in multibacillary leprosy; a study from Brazil. *Lepr. Rev.* 75, 143–152.
- R Development Core Team, 2005. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rambukkana, A., 2001. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 21–27.
- Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N., Salzer, J.L., 2002. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* 296, 27–31.
- Rea, T.H., Sieling, P.A., 1998. Delayed-type hypersensitivity reactions followed by erythema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr.* 66, 316–327.
- Ridley, D.S., Jopling, W.H., 1966. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34 (3), 255–273.
- Roy, S., Frodsham, A., Saha, B., Hazra, S.K., Mascie-Taylor, C.G., Hill, A.V., 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J. Infect. Dis.* 179 (1), 187–191.
- Sampaio, E.P., Caneshi, J.R., Nery, J.A., Duppre, N.C., Pereira, G.M., Vieira, L.M., Moreira, A.L., Kaplan, G., Sarno, E.N., 1995. Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect. Immun.* 63, 1848–1854.
- Sampaio, E.P., Moraes, M.O., Nery, J.A.C., Santos, A.R., Matos, H.C., Sarno, E.N., 1998. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumor necrosis factor- α production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin. Exp. Immunol.* 111, 300–308.
- Santos, A.R., Suffys, P.N., Vanderborght, P.R., Moraes, M.O., Vieira, L.M.M., Cabello, P.H., Bakker, A.M., Matos, H.J., Huizinga, T.J.W., Ottenhoff, T.H.M., Sampaio, E.P., Sarno, E.N., 2002. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.* 186, 1687–1691.
- Shaw, M.A., Donaldson, I.J., Collins, A., Peacock, C.S., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., Ramos, F., Silveira, F., Blackwell, J.M., 2001. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2 (4), 196–204.
- Spierings, E., de Boer, T., Wieles, B., Adams, L.B., Marani, E., Ottenhoff, T.H., 2001. *Mycobacterium leprae*-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4⁺ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J. Immunol.* 166, 5883–5888.
- Tapinos, N., Ohnishi, M., Rambukkana, A., 2006. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat. Med.* 12 (8), 961–966.
- Vanderborght, P.R., Pacheco, A.G., Moraes, M.E., Antoni, G., Romero, M., Verville, A., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Schurr, E., Sarno, E.N., Moraes, M.O., 2007. HLA-DRB1(*)04 and DRB1(*)10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 8 (4), 320–324.
- Zhang, S., Dailey, G.M., Kwan, E., Glasheen, B.M., Sroga, G.E., Page-McCaw, A., 2006. An MMP liberates the Ninjurin A ectodomain to signal a loss of cell adhesion. *Genes Dev.* 20 (14), 1899–1910.